

THESIS

GIESSEN

1967

Untersuchungen zur Aufnahme von
phenolischen Ligninspaltstücken durch die
Wurzeln von Weizenkeimpflanzen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von
Hans Harms
aus Sillenstede / Kr. Friesland

1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

Untersuchungen zur Aufnahme von
phenolischen Ligninpolymeren durch die
Wurzeln von Wundheilpflanzen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Untersuchungen zur Aufnahme von
phenolischen Ligninspaltstücken durch die
Wurzeln von Weizenkeimpflanzen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Justus Liebig-Universität

Gießen

vorgelegt von

Hans Harms

aus Sillenstede / Kr. Friesland

D 26

Dekan: Prof. Dr. Ph. D. D. Gaier

I. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Steubing

II. Berichterstatter: Prof. Dr. D. v. Denffer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 6. 1967

Aufgrund eines freundlichen Übereinkommens zwischen Frau Prof. Dr. L. Steubing, Botanisches Institut der Justus Liebig-Universität Giessen und Herrn Prof. Dr. W. Flaig, Direktor des Instituts für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode, war es möglich, die Arbeit im Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode durchzuführen. Die Abfassung des Themas entspricht dem gemeinsamen Interesse der beiden Arbeitskreise.

Frau Prof. Dr. Steubing und Herrn Prof. Dr. Flaig danke ich für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse. Herrn Prof. Dr. Flaig danke ich weiterhin für die wohlwollende Unterstützung und Förderung während meiner Tätigkeit im Institut für Biochemie des Bodens.

Ferner danke ich Herrn Dr. K. Haider und Herrn Dr. H. Söchtig, den Leitern der Arbeitsgebiete Biochemie der Mikroorganismen und Biochemie der Pflanze dieses Instituts für ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Anlage und Durchführung der Versuche.

Dem Leiter des Isotopen-Laboratoriums der Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Herrn Dipl.-Chem. H. Keppel, danke ich für die Zurverfügungstellung der Meßapparaturen.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung und Problemstellung.....	7
1.1	Die Aufnahme von Phenolen und Phenolderivaten durch die Wurzel und ihre Umwandlung in der Pflanze.....	9
1.2	Phenolstoffwechsel in der Pflanze.....	13
1.21	Ligninbildung und Ligninabbau durch Mikroorganismen.....	27
2.	Untersuchungsmethoden.....	30
2.1	Anzucht und Aufbereitung des Pflanzenmaterials...	30
2.11	Sterilisation der Samenkörner.....	31
2.12	Anzucht der Weizenpflanzen.....	33
2.13	Aufbereitung des Pflanzenmaterials.....	36
2.14	Nachweis der Phenolcarbonsäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.....	37
2.15	Nachweis von Phenolcarbonsäuren durch UV-Spektroskopie.....	38
2.2	Synthese der markierten Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren.....	40
2.3	Methoden bei den Versuchen mit ^{14}C -markierten Phenolen.....	42
2.31	Überführung der Proben in Kohlendioxid und in Bariumcarbonat durch Oxydation mit der Apparatur nach Schmid und Schmid.....	42
2.32	Überführung der Proben in Kohlendioxid und in Bariumcarbonat durch Oxydation mit der Mikro-Verbrennungsapparatur nach Schöniger.....	44
2.33	Messung der Radioaktivität des Bariumcarbonats...	45
2.34	Messung der ^{14}C -Aktivität auf Chromatogrammen....	45
2.4	Synthese der 1-(p-Hydroxybenzoyl)- β -D-glucose....	46
3.	V Versuchsergebnisse.....	47
3.1	Voruntersuchungen mit nichtmarkierten Verbindungen.....	47

3.11	Vanillin.....	48
3.12	Vanillinsäure.....	48
3.13	Syringasäure.....	48
3.14	Die Abhängigkeit der Aufnahme von Vanillinsäure von der Wasserstoffionenkonzentration der Nähr- lösung und der Luftfeuchtigkeit.....	49
3.2	Untersuchungen mit markierten Verbindungen.....	51
3.21	Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme der Carboxyl- ¹⁴ C-markierten Va- nillinsäure.....	51
3.22	Der Einfluß der Inkubationszeit und des Alters der Pflanzen auf die Aufnahme von Carboxyl- ¹⁴ C- markierter p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Syringasäure.....	54
3.221	Auftrennung der in der Pflanzensubstanz ent- haltenen ¹⁴ C-Aktivität durch verschiedene Ex- traktionsmittel.....	58
3.222	Charakterisierung der verschiedenen Extrakte mittels der Dünnschichtchromatographie und UV-Spektroskopie.....	62
3.223	Aktivitätsverteilung auf den Dünnschichtplatten und Hydrolyse der Extrakte mittels verschieden konzentrierter Schwefelsäure.....	67
3.224	Hydrolyse der Extrakte mittels einer B-Glyco- sidase.....	76
3.3	Untersuchungen über die Kohlendioxidabspaltung aus verschiedenen Carboxyl- ¹⁴ C- und Methoxyl- ¹⁴ C-markierten Phenolcarbonsäuren durch Sproß- und Wurzelstücke in der Warburg-Apparatur.....	79
3.4	Die CO ₂ -Aufnahme durch die Wurzel und der Ein- bau in Aminosäuren.....	83
4.	Diskussion der Versuchsergebnisse.....	88
5.	Zusammenfassung.....	102
	Literaturnachweis.....	105

1. Einleitung und Problemstellung

=====

Aus Fauna und Flora gelangen nach dem Absterben eine Vielzahl organischer Verbindungen in den Boden. Diese Inhaltsstoffe von Pflanze und Tier bestehen hauptsächlich aus Kohlehydraten, Lignin, Proteinen, Phosphatiden und Fetten sowie den sekundären Inhaltsstoffen wie z.B. Terpene, Glycoside, Alkaloide, Phenolderivate usw. Sie können von den heterotrophen Mikroorganismen als Nährstoffquelle genutzt werden und unterliegen schließlich im Verlauf der Prozesse im Boden der Mineralisierung. Es erhebt sich nun die Frage, ob einige der im Laufe der Umwandlung entstehenden organischen Substanzen auch von den Pflanzen direkt aufgenommen und möglicherweise in den Stoffwechsel mit einbezogen werden.

Versuche zur Beantwortung dieser Frage fanden sich in einer großen Anzahl von Untersuchungen, die mit den verschiedensten organischen Verbindungen durchgeführt worden sind. Vor allem VIRTANEN (1947, 1951, 1957) zeigte, daß die seit Liebig allgemein verbreitete Annahme, die höheren Pflanzen könnten ihren Stickstoffbedarf nur aus anorganischen N-Verbindungen decken, nicht ganz zurecht besteht, da er zeigen konnte, daß auch Aminosäuren von der Pflanze aufgenommen werden. WINTER und RINGS-WILLEKE (1959) applizierten den Pflanzen ein umfassendes Spektrum der verschiedensten Alkaloide und konnten die Aufnahme dieser Verbindungen durch die Wurzel qualitativ nachweisen. In weiteren Untersuchungen lieferten WINTER und Mitarbeiter weitere Hinweise über die Aufnahme von Phenolderivaten und Cumarinen. Eine zusammenfassende Darstellung über die Aufnahme organischer Verbindungen durch die Wurzeln der höheren Pflanze findet sich bei SCHÖNBECK (1962). Den Mechanismus der Aufnahme solch großer Moleküle wie Proteine etc. diskutierte BOGEN (1959) unter dem Gesichtspunkt der Pinocytose als einen nicht osmotischen Prozeß.

Besonders in neuerer Zeit wurden Beobachtungen gemacht, daß von den organischen Substanzen des Bodens eine Wirkung auf das Wachstum der Pflanze ausgehen muß, die nicht mit einer reinen Nährstoffwirkung dieser Substanzen erklärt werden kann. Diese Arbeiten wurden von FLAIG und SÖCHTIG (1962) zusammenfassend dargestellt. Die Wirkungen dieser organischen Bodensubstanz oder von mit ihr vergleichbare Modellschubstanz machten sich in einer Anreicherung der reduzierenden Zucker und der Ketocarbonsäuren in den Sprossen bemerkbar und führten zu einer erhöhten Welkeresistenz. Mit Humusfraktionen behandelte Pflanzen zeigten nach GUMINSKI (1958) eine Beeinflussung des Habitus und des Wachstums der Versuchspflanzen sowie des Chlorophyllgehaltes, der Atmung und des Gehaltes an reduzierenden Zuckern. SCHMID und FLAIG (1962) stellten eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung durch phenolische Verbindungen fest und leiteten daraus eine zentrale Wirkung auf den Stoffwechsel ab. PILET (1966) diskutierte, daß die phenolischen Verbindungen in Abhängigkeit von der Konzentration einen Einfluß auf den Auxingehalt und den Auxincatabolismus haben, während GORDON und PALEG (1961) zeigten, daß Phenole unter oxydierenden Bedingungen bei Tryptophan eine oxydative Desaminierung unter Bildung von Indolelessigsäure bewirken.

Da beim mikrobiellen Lignin- und Huminsäureabbau wahrscheinlich ständig Phenole vom Typus der Phenolcarbonsäuren freigesetzt werden und diese Substanzen eine ausgeprägte Wirksamkeit auf das Pflanzenwachstum besitzen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und in welchem Umfange eine Aufnahme von definierten phenolischen Carboxyl¹⁴C-markierten Ligninspaltstücken durch die unbeschädigten Wurzeln von Weizenkeimpflanzen erfolgt. Da unter nicht sterilen Bedingungen alle einer Pflanze angebotenen phenolischen Verbindungen weiter abgebaut werden, mußte durch Anzucht und weitere Kultur der gesamten Pflanze unter sterilen Kulturbedingungen ein Abbau bzw. eine Umwandlung der applizierten Verbindungen unterbunden werden.

Da sich im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen herausstellte, daß von den Pflanzen aktives $^{14}\text{CO}_2$ der Carboxylgruppe der applizierten Phenolcarbonsäuren freigesetzt wird, das von der Pflanzenwurzel nachweislich wieder absorbiert werden kann, wurde untersucht, ob das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ durch einen vollständigen Abbau der Phenolcarbonsäuren entsteht oder ob dieses vornehmlich durch Abspaltung der Carboxylgruppe gebildet wird. Ebenfalls wird eine Festlegung des abgespaltenen markierten Kohlendioxyds in Folgeprodukte des Tricarbonsaurecyclus, besonders in Aminosäuren, sowie des Kohlenhydratstoffwechsels untersucht.

1.1 Die Aufnahme von Phenolen und Phenolderivaten durch die Wurzel und ihre Umwandlung in der Pflanze.

Die Größenordnung in der Aufnahme organischer Stoffe durch die Pflanzenwurzel, wie sie im 18. und 19. Jahrhundert von WALLERIUS (1761) und THAER (1821) vertreten wurde, hat sich bisher niemals bestätigt. Durch die Lehren Liebig's, der den Beweis erbrachte, daß die Pflanzen zu ihrer Entwicklung keiner organischen Stoffe bedürfen, wurde die Bedeutung der organischen Stoffe noch weiter zurückgedrängt. Aber mit der wachsenden Kenntnis über Wirkstoffe wurde die organische Masse des Bodens wieder Gegenstand des Interesses, da verschiedene Beobachtungen einen Zusammenhang zwischen organischen Substanzen des Bodens und dem Wachstum der Pflanze vermuten lassen. So konnten FLAIG und OTTO (1951), FLAIG und SAALBACH (1955, 1956), SAALBACH (1951), CHRISTEWA (1956), GUMINSKI (1958), McCALLA und HASKINS (1964) in einer Vielzahl von Untersuchungen mit Hilfe synthetischer Ligninspaltstücke und Synthesehuminsäuren zeigen, daß diese Substanzen die Keimung und das Wurzelwachstum positiv beeinflussen. In Untersuchungen über die Einwirkung von Thymohydrochinon auf den Stoffwechsel der Pflanzen ergab sich aufgrund der Untersuchungen von SCHMID und FLAIG (1962), daß diese Substanz in zentraler Stelle im Stoffwechsel eingreift und in Abhängigkeit von der

Konzentration die oxydative Phosphorylierung unterschiedlich stark entkoppelt.

Die Phenole nehmen nicht nur Einfluß auf das Stoffwechselgeschehen der Pflanze, sondern können auch morphologische Veränderungen hervorrufen. SEIDEL (1965, 1966) konnte z.B. in ihren Untersuchungen über den Phenolabbau in Gewässern feststellen, daß mit steigender Phenolkonzentration die Anlagen der Stomata unregelmäßiger wurden. Außerdem bildeten die Halme von *Scirpus lacustris*, die in Phenollösung standen, Hydropoten aus, die bei dieser Pflanze sonst nicht bekannt sind.

Über die Aufnahme von Phenolen und Phenolderivaten aus dem Ligninabbau und ihren Einfluß auf den Pflanzenstoffwechsel liegen bereits einige Untersuchungen vor. Da freies Phenol nur in wenigen Pflanzenarten (Stamm, Nadeln und Zapfen von *Pinus silvestris*) nachgewiesen wurde, klärten WINTER, PREUSS und SCHONBECK (1959) die Frage, ob phenolartige Verbindungen als allochthone Substanzen in den Pflanzen vorhanden sein können. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten konnten sie der Nährlösung zugesetzte Phenolverbindungen in den oberirdischen Organen von Weizen- und Bohnenpflanzen nachweisen. Dabei betrug die Mindestkonzentration an Phenolen 20 $\mu\text{g/ml}$ Nährlösung.

In weiteren Untersuchungen zeigten WINTER, BRÜSEWITZ und SCHÖNBECK (1960), daß aus Pflanzenmaterial, das dem Boden aufgelegt wurde, organische Stoffe wie Arbutin, Phlorizin, Aesculin, Cumarin sowie Juglon ausgewaschen wurden. Diese ausgewaschenen Substanzen wurden von den Pflanzenwurzeln wieder resorbiert und in den Testpflanzen z.T. verändert. Die Autoren schlossen auf eine Aufnahme dieser Verbindungen durch Vergleiche von Pflanzen, die in Böden ohne oder mit einer solchen Bedeckung wuchsen. Die im Boden mit Auflage und in den darauf gewachsenen Versuchspflanzen zusätzlich auftretende Substanzen

wurden als durch die Wurzel aufgenommene Verbindungen angesprochen. Aufgrund der Ergebnisse folgerten die Autoren, daß das organische Material im oder auf dem Boden als ökologischer Faktor unmittelbar die chemische Zusammensetzung einer Pflanze verändert .

In Nährlösungen, denen jeweils 50-100 $\mu\text{g/ml}$ p-Hydroxybenzoesäure, p-Hydroxyzimtsäure, Vanillinsäure, Ferulasäure, Salizylsäure, Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon, Phloroglucin, Guajakol, Thymol bzw. Gallussaure zugesetzt worden waren, kultivierten ebenfalls WINTER, PREUSS und SCHONBECK (1959) sechs Tage alte Weizenpflanzen. Nach einer Inkubationszeit von 2-48 Stunden wurden die Wurzeln der Pflanzen mit Methanol extrahiert und papierchromatographisch untersucht. Als Ergebnis zeigte sich, daß Gallussäure, Thymol, Guajakol sich weder in unveränderter Form nachweisen ließen, noch neugebildete Substanzen erfaßt werden konnten. Alle übrigen Substanzen wurden von den Weizenwurzeln resorbiert und z.T. in andere vor allem glykosidische Verbindungen überführt. Bei Fütterung von Hydrochinon und Phloroglucin bildeten sich die Glycoside Arbutin bzw. Phlorin. Brenzcatechin und Resorcin führten ebenfalls zur Bildung von Glykosiden. p-Hydroxyzimtsäure und Ferulasäure wurden in der Pflanze als Baustein der Chlorogensäure und anderen Verbindungen nachgewiesen. p-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure traten als allochthone Substanzen in der Wurzel auf.

In weiteren Untersuchungen stellten die Autoren (1959) fest, daß die neugebildeten Glycoside zuerst in der Wurzel und später dann im Sproß nachweisbar waren. Erst wenn eine Sättigung erfolgte und freies Hydrochinon bzw. Phloroglucin in der Wurzel auftrat, fand man auch die Glycoside im Sproß. Hieraus zogen sie die Schlußfolgerung, daß die Glycoside nicht von der Wurzel in den Sproß wandern, sondern nur das Aglykon, das sich dann im Sproß mit dem Zucker zum Glycosid verbindet.

Auf die Aufnahme der zugesetzten Verbindungen sowie deren Umwandlung in Glycoside wurde aus einem chromatographischen Vergleich der Extrakte aus behandelten und unbehandelten Pflanzen geschlossen, so daß der direkte Nachweis einer solchen Aufnahme fehlt. Weiterhin wurde bei den Untersuchungen zur Aufnahme von Phenolen und Phenolderivaten durch die Pflanzenwurzel in den vorher zitierten Arbeiten unter nicht sterilen Kulturbedingungen gearbeitet. Wie unter anderen SÖCHTIG (1961) jedoch feststellen konnte, unterliegen die phenolischen Ligninspaltstücke im Boden und in der Nährlösung einem relativ raschen Abbau durch Mikroorganismen, der bis zum Kohlendioxid führt. Nach Untersuchungen von FÜHR (1962) wird Kohlendioxid aber sowohl gasförmig als auch als HCO_3^- -Ion von der Pflanzenwurzel aufgenommen, so daß man bei Untersuchungen unter nicht sterilen Kulturbedingungen zu falschen Schlußfolgerungen bezüglich der Aufnahme und Umwandlung einer definierten organischen Substanz durch die Pflanze kommen kann. Weiterhin wurden in den zitierten Untersuchungen keine quantitativen Angaben über die Aufnahme dieser Substanzen gemacht. Für die Ermittlung der Bedeutung der Aufnahme organischer Verbindungen als ökologischer Faktor für die Pflanze sind aber quantitative Angaben unerläßlich.

Der Mechanismus der Aufnahme organischer Moleküle konnte nur zum geringsten Teil auf der Basis der Osmose erklärt werden, so daß BOGEN (1959) die Aufnahme organischer Moleküle auf nichtosmotische Prozesse zurückführte. Einen solchen nicht-osmotischen Prozeß stellen die Carrier-Systeme dar, die nicht allein für anorganische (Sammelreferat MENGEL und MARSCHNER 1963) und organische Ionen (BRITT und GERHARD 1958, BIRT und HIRT 1958) sondern auch für Anelektrolyte von PENNELL und WEATHERLEY (1958), STEIN (1958), LICHSTEIN und FERGUSON (1958) postuliert wurden. Hierbei werden die Ionen bzw. Moleküle bei ihrem Transport durch die Membran an einen Carrier (Träger) gebunden. Die Membran ist für den Carrier und für den Carrier-Ion-bzw. Molekül-Komplex permeabel, während sie für das Ion

bzw. Molekül selbst aber impermeabel ist. Der Carrier bindet an der zum Außenmedium gelegenen Seite der Membran das Ion bzw. Molekül, wandert als Komplex zur gegenüberliegenden Seite und gibt hier das Substrat an das Innenmedium ab. MONOD (1959) bzw. COHEN und MONOD (1957) sowie andere Autoren haben bewiesen, daß zumindest ein Teil der Carrier Enzyme sind. Für sie werden die Bezeichnungen Permeasen, Transportasen und Translocasen verwendet.

Ein weiterer Aufnahmemechanismus stellt die Phagocytose bzw. Pinocytose dar. Dieser Mechanismus wurde vor allem bei der Aufnahme hochmolekularer Stoffe angenommen (z.B. Lysozym und Hämoglobin bei Wurzelzellen JENSEN und McLAREN 1960, RN-ase und Cytochrom c bei Amoeba proteus SCHUMAKER 1958). Bei der Pinocytose wird das Substrat durch Einschließung kleiner Flüssigkeitsmengen durch Plasmafortsätze bzw. Invaginationen der Plasmahaut mit anschließender Verlagerung der Vacuole ins Zellinnere aufgenommen. Inwieweit die Pinocytose als eine aktive Aufnahme gewertet werden kann, läßt sich noch nicht entscheiden.

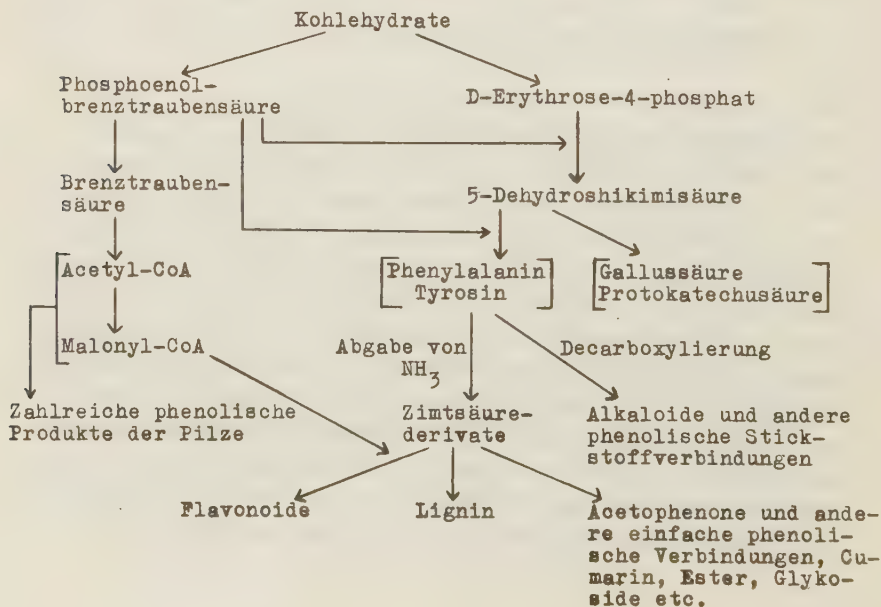
1.2 Phenolstoffwechsel in der Pflanze

Die phenolischen Verbindungen in der Pflanze leiten sich von verschiedenen primären Stoffwechselprodukten ab. Besonders die Anwendung markierter Verbindungen trug zur Aufklärung der Entstehung phenolischer Verbindungen bei. So konnte gezeigt werden, daß die Bildung von phenolischen Verbindungen auf zwei verschiedenen Wegen verläuft. Der erste Weg ist die Biosynthese aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA-Einheiten durch eine Aldolkondensation (BIRCH und Mitarbeiter 1953, 1955). Diese Möglichkeit der Phenolbildung ist besonders bei Pilzen verbreitet, findet jedoch auch bei höheren Pflanzen statt und resultiert aus einer Veränderung der Fettsäuresynthese. Auf diesem Weg erfolgt vornehmlich die Biosynthese von meta-ständig-substituierten Polyphenolen, also von Phloroglucin- und Resorcin-Derivaten. Nach den Arbeiten von BIRCH und

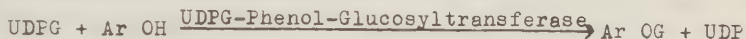
DONOVAN (1953) leiten sich aber auch die Anthrachinon-Derivate wie z.B. das Hypericin von Acetyl-CoA ab. In einer neuen Arbeit erbrachten LEISTNER und ZENK (1967) den Nachweis, daß die Ringe B und C des 1,2 Dihydroxyanthrachinons (Alizarin) aus Acetyl-CoA-Einheiten aufgebaut werden, während der Ring A über Shikimisäure gebildet wird. Im Gegensatz dazu scheinen sich in höheren Pflanzen die ortho-ständig-substituierten phenolischen Verbindungen von dem Glucose-Stoffwechsel abzuleiten. Hierbei können entweder aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tyrosin als intermediäre Zwischenprodukte dienen oder sie leiten sich von Umwandlungsprodukten der Glucose wie Shikimisäure ab. SPRINSON (1960) erbrachte den Beweis, daß 5-Dehydroshikimisäure mittels eines Enzymsystems aus D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolbrenztraubensäure gebildet wird.

Ein vermutliches Reaktionsschema über die Bildung phenolischer Verbindungen gab NEISH (1964).

Schema 1: Mögliche Biosynthesewege der Phenole nach NEISH (1964)



Wie in mehreren Untersuchungen von PRIDHAM and SALTMARSH (1960), PRIDHAM (1964) sowie HUTCHINSON, ROY and TOWERS (1958) eindeutig gezeigt werden konnte, werden den Pflanzen applizierte Phenole, wenn sie in die Blätter und Sämlinge höherer Pflanzen aufgenommen werden, sehr rasch in mono- β -D-Glucoside oder Glucoseester (HARBORNE and CORNER 1961) übergeführt. Als Glucosedonor für diese Reaktion fungiert Uridinphosphoglucose (UDPG), die in höheren Pflanzen ubiquitär vorkommt. Die Reaktion verläuft wie folgt:



Größere Mengen der freien Phenole finden sich nur sehr selten in den Pflanzen. Die Glycoside und Ester werden in allen Teilen der Pflanze synthetisiert.

HARBORNE und CORNER (1961) fanden, daß nach Fütterung der Blätter verschiedener Pflanzen mit Zimtsäure, o-Cumarsäure, m-Cumarsäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure die entsprechenden Glucoseester die Hauptprodukte waren, die gebildet wurden.

RUNECKLES und WOLLRICH (1963) hingegen isolierten aus Tabakblättern, denen p-Cumarsäure und Ferulasäure appliziert worden waren, mehr die entsprechenden Glucoside als die Ester. Die Bildung von Glucoseestern scheint aber im Pflanzenreich allgemein verbreitet zu sein. So isolierten STROH, SCHÄFER und HASCHKE (1962) aus Blütenblättern von *Sambucus nigra* die Glucoseester der Kaffeesäure und Ferulasäure; BIRKHOFER, KAISER, NOUVERTNE und THOMAS (1961) sowie BIRKHOFER und KAISER (1962) aus Blütenblättern bzw. Früchten verschiedener Pflanzen die Glucoseester der p-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und p-Hydroxybenzoesäure. ASEN und EMSWELLER (1962) isolierten sowohl Ferulasäure und p-Cumarsäure als auch ihre Glucoseester aus Samen und Pericarp zweier Lilienhybriden. Annähernd 60 % der insgesamt vorhandenen Ferulasäure in der inter-spezifischen Hybride lagen als freie Ferulasäure vor, während die intra-spezifische Hybride nur 6 % freie Säure enthielt. Die Samen der inter-

spezifischen Hybride keimten nicht, während die Samen der intra-spezifischen Hybride normal keimten und zu normalen Sämlingen heranwuchsen. Die Autoren schreiben die anomale Physiologie der hohen Konzentration freier Ferulasäure zu und diskutierten eine mögliche Störung des Entgiftungsmechanismus durch Esterbildung.

Die einzelnen Pflanzenspezies scheinen sich in ihrer Fähigkeit, individuelle Ester oder Glucoside von den applizierten Phenolen zu bilden zu unterscheiden. Die Bildung eines spezifischen Esters hängt wahrscheinlich nicht nur von der Pflanze oder einem speziellen Organ ab, sondern vielleicht auch von dem augenblicklichen physiologischen Zustand der Pflanze oder des Organs. Die Fähigkeit, Glucoseester und Glucoside aus Phenolen zu bilden, scheint aber in der Physiologie der Pflanze von Bedeutung zu sein.

Die Beziehungen gewisser Phenolcarbonsäuren untereinander wurden durch Verwendung markierter Verbindungen abgeleitet. So haben REZNIK und URBAN (1957) den Umbau von ^{14}C -markierter Ferulasäure nachgewiesen. Jungen Sonnenblumen-, Weizen- und Maispflanzen ist diese Phenolcarbonsäure durch Infiltration verabreicht worden. Die Radioaktivität ist in Chlorogensäure, Kaffeesäure und in Scopolin wiedergefunden worden.

Bei der Klärung der Frage der Biosynthese von Gallussäure folgte ZENK (1964a), daß die Gallussäure-Biosynthese in Anacardiaceen wahrscheinlich vornehmlich über den Phenylpropanstoffwechsel verläuft, statt direkt über die Dehydrierung der 5-Dehydroshikimisäure, wie sie bei *Phycomyces blakesleeana* (BRUCKER et. al. 1958) nachgewiesen wurde. ZENK führte seine Versuche an der Pflanze *Rhus typhina* durch, die Gallotannin als Gerbstoff enthält. Ausgestanzte Blattstücke wurden in ^{14}C -markierten Lösungen von Glucose -2- ^{14}C ; DL-Phenylalanin-3- ^{14}C ; DL-Tyrosin-3- ^{14}C und Benzoesäure-7- ^{14}C 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Von den angebotenen Substanzen zeigte Phenylalanin

die höchste Einbaurrate, während diese nach der Inkubation mit den anderen Verbindungen wesentlich geringer war. Bei Inkubation von Phenylalanin enthielt die Carboxylgruppe der Gallussäure 92 % der Gesamtaktivität der Gallussäure. Da der Umbau des Phenylalanins zu den aromatischen C_6-C_1 -Säuren über Zimtsäure mit nachfolgender Hydroxylierung des Ringes und anschließender β -Oxydation der Seitenkette erfolgt, wurde folgender Biosyntheseweg der Gallussaure vorgeschlagen.

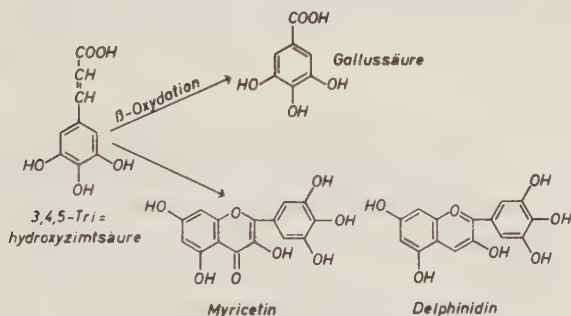
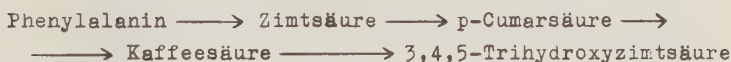


Abb. 1: Biosyntheseweg der Gallussäure nach ZENK (1964).

Die als Zwischenprodukt geforderte und bisher in der Natur noch nicht aufgefundene 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure könnte als Thioester des CoA einerseits durch β -Oxydation zu Gallussäure abgebaut werden, andererseits aber auch in das Anthocyanidin,

Delphinidin und in Myricetin eingebaut werden. Für diese Auffassung spricht z.B. auch das gleichzeitige Auftreten von Myricetin und Gallotannin in der Gattung Rhus.

Als weiteres untersuchten MEIER und ZENK (1965) den Einbau von 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure in Delphinidin im Vergleich zu den niedriger hydroxylierten Zimtsäuren wie Kaffeesäure und p-Cumarsäure. Diese Versuche sollten darüber Aufschluß geben, ob von der Pflanze die Trihydroxyzimtsäure überhaupt zur Synthese von Delphinidin herangezogen werden kann und welchen Einfluß das Hydroxylierungsmuster dabei hat. Als Ergebnis zeigte sich, daß die Einbauraten der applizierten Zimtsäuren in Delphinidin von p-Cumarsäure über Kaffeesäure zu Trihydroxyzimtsäure ansteigen. HESS (1963, 1964) vertrat ebenfalls die Auffassung, daß die Einführung der Hydroxylgruppen am Ring B der Anthocyane auf der Stufe der Zimtsäuren erfolgen kann.

Die Vermutung, daß Phenylpropan-Verbindungen wahrscheinlich durch β -Oxydation zu den entsprechenden Benzoesäuren abgebaut werden, legte den Gedanken nahe, daß diese Säuren Zwischenprodukte in der Umwandlung der Phenylpropane zu den aromatischen C_6-C_1 -Verbindungen darstellen. So wurde z.B. von GRISDALE und TOWERS (1960) gezeigt, daß sich das Hydrochinon im Arbutin von phenylpropanoiden Verbindungen herleitet.

Anknüpfend an diese Arbeit verfolgte ZENK (1964b) zwei denkbare Biosynthesewege des Hydrochinonmoleküls aus hydroxylierten Benzoesäuren.

1. Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure) könnte durch teilweisen Abbau und Hydroxylierung der Zimtsäure entstehen und dann zum Hydrochinon decarboxyliert werden.
2. p-Hydroxybenzoesäure, die aus p-Cumarsäure gebildet wird, könnte oxydativ decarboxyliert werden, um das Hydrochinon zu ergeben.

Um diese zwei Möglichkeiten zu untersuchen, wurde Ring- ^{14}C -markierte, o-, m- und p-Hydroxybenzoesäure sowie Gentisinsäure Blattstückchen von *Bergenia crassifolia* verabreicht. Als Ergebnis der Fütterungsexperimente zeigte sich, daß o- und m-Hydroxybenzoesäure wie auch Gentisinsäure von der Pflanze zwar aufgenommen, aber nicht in das Arbutin eingebaut wurden. Die gesamte Radioaktivität wurde in den Glucosiden dieser Säuren gefunden. p-Hydroxybenzoesäure wurde jedoch bis zu 10 % in Arbutin überführt, während die restlichen 90 % der aufgenommenen Säure ebenfalls als Glucosid vorlagen. Eine Hydrolyse des nach p-Hydroxybenzoesäurefütterung gewonnenen Arbutins mit 2 n HCl ergab, daß die gesamte Radioaktivität des Arbutins nach chromatographischer Analyse im Hydrochinon vorlag. Bei Fütterung von Carboxyl- ^{14}C -markierter p-Hydroxybenzoesäure ließ sich im Arbutin keine Radioaktivität feststellen.

Nach diesen Ergebnissen ergibt sich für die Biogenese von Arbutin in höheren Pflanzen folgender Weg.

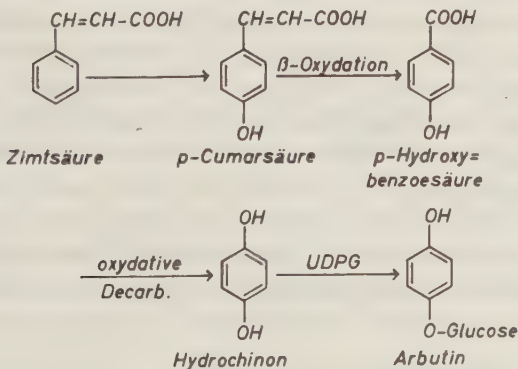


Abb. 2: Biogenese des Arbutins nach ZENK (1964b)

Phenylalanin wird durch Phenylalanase zu Zimtsäure desaminiert und diese zu p-Cumarsäure hydroxyliert. p-Cumarsäure wird weiterhin zu p-Hydroxybenzoesäure abgebaut und durch oxydative Decarboxylierung in p-Hydrochinon überführt, das seinerseits durch Uridindiphosphoglucose zu Arbutin glucosidiert wird.

Die Hypothese von GEISSMAN und HINREINER (1952), daß die C_6-C_1 -Verbindungen in höheren Pflanzen aus Phenylpropan-Verbindungen unter Abspaltung eines Zwei-Kohlenstoff-Fragmentes aus der Seitenkette gebildet werden können, wurde ebenfalls durch die Untersuchungen von EL-BAYOUNI, CHEN, IBRAHIM, NEISH und TOWERS (1964) bestätigt.

Wenn - nach diesen Autoren - markiertes Phenylalanin oder markierte Zimtsäure in Blattsegmente verschiedener Pflanzenspezies infiltriert wurde, so waren die gebildeten Phenolcarbonsäuren charakteristisch für die jeweilige Pflanzenart. Z.B. bildete *Oryza sativa* aus Phenylalanin p-Cumarsäure und Ferulasäure. *Gaultheria procumbens* (alte Blätter) bildete hauptsächlich p-Cumarsäure, während in *Primula acaulis* o-Cumarsäure und o-Hydroxybenzoesäure synthetisiert wurden. Die hauptsächlichsten Säuren, die in erster Linie aus Zimtsäure gebildet wurden, waren p-Cumarsäure und o-Cumarsäure in *Gaultheria* (junge Blätter); p-Cumarsäure und Kaffeesäure in *Teucrium lusitanicum* und kleine Mengen von p-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure in *Hydrangea macrophylla*.

Zusammenfassend deutet sich bei der Bildung einiger orthohydroxylierter Säuren in den verschiedenen untersuchten Pflanzenspezies folgende Reihenfolge an:

Zimtsäure - o-Cumarsäure - Salizylsäure - Gentisinsäure und o-Pyrocatechusäure.

In den gleichen Untersuchungen zeigten sie, daß p-Cumarsäure

in *Oryza*, *Hordeum vulgare*, *Maiantheum canadensis* und *Pelargonium hortorum* zu p-Hydroxybenzoesäure abgebaut wurde. In *Oryza*, *Hordeum* und *Pelargonium* wurde Ferulasäure zu Vanillinsäure umgewandelt.

Syringasäure wurde in *Oryza* und *Hordeum* aus Sinapinsäure gebildet. Kaffeesäure wurde von *Oryza* Blattsegmenten teilweise zu Protocatechusäure abgebaut, die Hauptreaktion war jedoch die Methylierung zu Ferulasäure.

In Experimenten, in denen carboxylmarkierte Protocatechusäure fünf verschiedenen Pflanzenspezies appliziert wurde, zeigten sich bemerkenswerte Unterschiede. Diese Substanz wurde von *Pelargonium* zu Gallussäure hydroxyliert, während sie von *Maiantheum*, *Hordeum* und *Oryza* zu Vanillinsäure methyliert wurde.

Radioaktive Syringasäure konnte jedoch nach Fütterung von carboxylmarkierter Vanillinsäure nicht festgestellt werden. Auf den Chromatogrammen der Blattsegmente von vier verschiedenen Pflanzenarten, die mit ^{14}C -Vanillinsäure infiltriert waren, wurde, außer in der Vanillinsäure selbst, keine weitere Radioaktivität festgestellt.

Zusammenfassend zeigte sich in den Untersuchungen von EL BASYOUNI et.al. (1964), daß die Bildung von Hydroxybenzoesäuren in höheren Pflanzen über zwei Wege möglich ist. Einmal kann eine β -Oxydation der Zimtsäure und ihrer Hydroxy- und Methoxyderivate erfolgen und zum anderen eine Hydroxylierung und Methoxylierung bzw. Dehydroxylierung und Demethoxylierung der einfachen Glieder der $\text{C}_6\text{-C}_1$ Reihe.

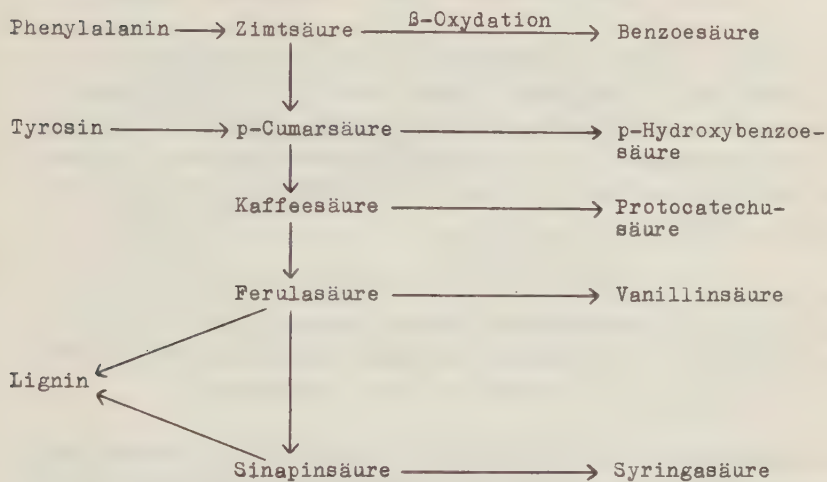
ZENK und MÜLLER (1964) bestätigten die Bildung der Hydroxybenzoesäuren und ihrer Methoxyderivate über die β -Oxydation der Zimtsäuren, jedoch stellten sie eine Hydroxylierung und Methoxy-

lierung bzw. Dehydroxylierung und Demethoxylierung auf der Stufe der Benzoesäure-Derivate sehr in Frage. Fütterungsexperimente mit Glucose-(2-¹⁴C), Phenylalanin-(3-¹⁴C), Tyrosin (3-¹⁴C) und p-Cumarsäure-(3-¹⁴C) zeigten, daß die letzten drei Substanzen in guten Ausbeuten in p-Hydroxybenzoesäure eingebaut wurden, wobei die p-Hydroxybenzoesäure aus Phenylalanin über die p-Cumarsäure unter Abspaltung der Seitenkette durch β -Oxydation gebildet wurde. Phenylalanin (3-¹⁴C) wurde von verschiedenen Pflanzen auch in Benzoesäure, Protocatechusäure und Vanillinsäure eingebaut. Das markierte C₃-Atom des Phenylalanins war in allen Fällen in der Carboxylgruppe der C₆-C₁ Säuren lokalisiert. Dies machte wahrscheinlich, daß die Benzoesäuren aus Zimtsäuren durch β -Oxydation hervorgehen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen GRISEBACH und VOLLMER (1963), die nach Infiltration von Zimtsäure (3-¹⁴C) in Blätter von *Gaultheria procumbens* in der Carboxylgruppe markierte Salicylsäure nachweisen konnten. ZENK (1965) zeigte ebenfalls, daß Vanillinsäure von *Vanilla planifolia* nur zu 4 % zu Vanillin reduziert werden konnte, während Ferulasäure zu 27 % in Vanillin eingebaut wurde.

•

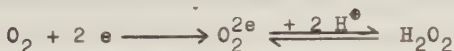
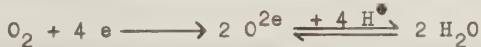
Ein Schema über die vermutlichen Zusammenhänge bei der Umwandlung der C₆-C₃ und C₆-C₁-Säuren in höheren Pflanzen wurde sowohl von EL-BASYOUNI, CHEN, IBRAHIM, NEISH und TOWERS (1964) als auch von ZENK und MÜLLER (1964) aufgestellt: In der Bildung der Benzoesäuren aus den entsprechenden Zimtsäuren durch β -Oxydation stimmen beide Schemata überein, jedoch bezweifelten ZENK und MÜLLER unter normalen Bedingungen in der lebenden Pflanze eine Umwandlung der hydroxylierten Benzoesäuren untereinander, wie sie von EL-BASYOUNI et.al. (1964) postuliert wurde.

Schema 2: Zusammenhang zwischen Zimtsäure- und Benzoesäure-Biosynthesen in der höheren Pflanze nach ZENK und MÜLLER (1964)



Umwandlungen von Phenolderivaten in der Pflanze oder in anderen Organismen erfolgen durch die Einwirkung von verschiedenen Phenol-oxydierenden Systemen. MASON (1957) unterschied drei Gruppen von Phenol-oxydierenden Enzymen. Sie katalysieren folgende allgemeine Reaktionen (KARLSON 1962).

1. Oxydasen (elektronenübertragende Oxydasen)



2. Oxygenasen (=Sauerstoff-Transferasen)



3. Mischfunktionelle Oxygenasen (hydroxylierende Enzyme)



(AH = Substratmolekül, DH_2 = Wasserstoffdonator)

Die Oxydasen übertragen Elektronen von o- und p-Diphenolen auf Sauerstoff, wobei direkt Wasser entsteht. Sie übertragen 4 Elektronen auf 1 O_2 . Zu dieser Enzymgruppe zählen die Laccase und die Catecholase, die o- und p-Diphenole oxydieren. Weiterhin die Ascorbinsäure - Oxydase, die in Pflanzen vielfach aufgefunden worden ist.

Die Zwei-Elektronen-transferierenden Oxydasen haben fast alle ein Flavin als prosthetische Gruppe. In den Pflanzen dürfte das Cytochrom c als Akzeptor des Wasserstoffs bzw. der 2 Elektronen dienen, um die Bildung des H_2O_2 zu umgehen.

Die Oxygenasen katalysieren z.B. die Spaltung der aromatischen Ringe von Diphenolen, wobei die Spaltung meist zwischen zwei Hydroxygruppen erfolgt. Als Mechanismus wird eine primäre Addition des Sauerstoffmoleküls unter Bildung eines zyklischen Peroxyds diskutiert.

Besonders viele Bodenbakterien und Pilze besitzen die Fähigkeit, die Phenole in dieser Art abzubauen und als Nährsubstrat zu verwerten.

Unter den Mischfunktionellen Oxygenasen sind besonders die unter dem Begriff Phenolase-Komplexe zusammengefaßten Enzyme von Bedeutung. Durch die Einwirkung der Phenolase (Tyrosinase, Phenol-oxydase) wird z.B. Tyrosin in Dihydroxyphenylalanin überführt und zum Chinon weiteroxydiert. Das Produkt der Oxygenierung, das Diphenol, übernimmt gleichzeitig die Rolle des Wasserstoffdonators. Diese Phenoloxidasen können aber auch die Oxydation von Diphenolen oder Monophenolen nur unter Elektronenentzug bewirken, ohne Hydroxylgruppen einzuführen.

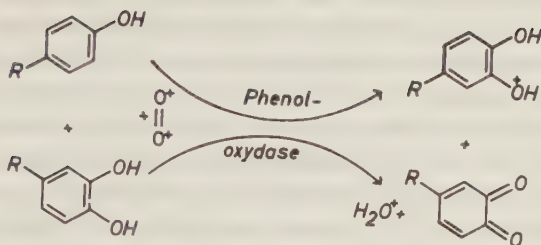


Abb. 3: Allgemeines Reaktionsschema (KARLSON)

Die meisten Phenoloxidasen können die Oxydation von Diphenolen (untere Zeile des Schemas) für sich, ohne Kopplung, vollziehen.

Weitere Mischfunktionelle Oxygenasen katalysieren Hydroxylierungen. Sie sind von Wasserstoffdonatoren wie TPNH oder DPNH abhängig. Bei der Reaktion wird ein Atom des Sauerstoffmoleküls in das Substrat eingeführt, während das zweite zu Wasser reduziert wird. In dieser Weise erfolgt z.B. der Übergang von Phenylalanin zu Tyrosin.

Bei der Einwirkung von Phenoloxidasen vom Laccasetypus, die aus Kulturen von *Polystictus versicolor* und anderen Weißfäulepilzen isoliert wurden, auf Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren konnten HAIDER, LIM und FLAIG (1962, 1964) und LIM (1965) zeigen, daß während der Oxydation eine Bildung von Polymerisaten über

chinoide Stufen erfolgte. Gleichzeitig fand auch eine Abspaltung der Carboxylgruppe statt, da die Bindung der Carboxylgruppe während der Oxydation von Phenolen zu Chinonen instabil wird. FLAIG und HAIDER (1961) sowie LIM (1965) führten den Nachweis, daß Phenoloxidasen aus *Polystictus versicolor* die Carboxylgruppe aus verschiedenen hydroxylierten und methoxylierten Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren in Abhängigkeit von den Substituenten unterschiedlich stark abspalten. Die prozentuale Abspaltung der Carboxylgruppe als CO_2 schwankte zwischen 30 % (p-Hydroxybenzoesäure) und 80 % (Syringensäure). Ebenfalls wurde aber auch bei der Einwirkung von ringspaltenden Oxygenasen die Carboxylgruppe als Kohlendioxid abgespalten; gleichzeitig erfolgte aber eine Spaltung des Ringes unter Bildung einer aliphatischen Ketosäure, die im weiteren Verlauf vollständig abgebaut wurde (STANIER und INGRAHAM 1954).

Im Pflanzenreich sind die Phenolasen allgemein verbreitet. Unter anderem bewirken sie z.B. die Dunkelfärbung der Schnittflächen von Früchten etc. McCALLA und NEISH (1959) fanden in *Salvia*-Schnitten, daß Zimtsäure durch mehrere Hydroxylierungsschritte über p-Cumarsäure in Kaffeesäure übergeführt wurde. Sie vermuteten dies, obwohl p-Cumarsäure als auch Kaffeesäure nur als Ester gefunden werden konnten. Wie die Autoren jedoch nachweisen konnten, fand die Umwandlung als freie Säure statt, bevor die Esterbildung einsetzte. In vitro konnten NAIR und VINING (1965) unter Verwendung von Aceton-Pulver von Spinat Zimtsäure in p-Cumarsäure und letztere in Kaffeesäure überführen.

HATTORI und SATO (1963) sowie SATO (1966) fanden, daß isolierte Chloroplasten von *Saxifraga stolonifera* durch eine Phenoloxydase p-Cumarsäure in Kaffeesäure umwandeln. Die gleiche Fähigkeit konnte für Chloroplasten verschiedener anderer Pflanzen nachgewiesen werden. Die Phenolase ließ

sich nur durch 8-Oxychinolin und Diäthylthiocarbamat hemmen, nicht durch 2,2-Dipyridyl. Dies läßt darauf schließen, daß das Enzym Kupfer und nicht Eisen als prosthetische Gruppe enthält.

In keimenden Salatsamen fand MAYER (1961, 1962) eine lösliche und eine an Mitochondrien gebundene Phenolase. Die Enzyme wurden gegen 4-Methylbrenzcatechin (I) Dopa (=Dihydroxyphenylalanin) (II), Kaffeesäure (III), p-Kresol (IV), Tyrosin (V), Chlorogensäure (VI) und Chinol (VII) getestet. I, II und III wurden durch alle Enzympräparate oxydiert, während das an Mitochondrien gebundene Enzym nicht in der Lage war IV, V, VI und VII zu oxydieren.

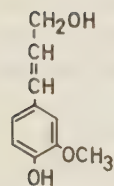
Aus den Untersuchungen über den Einbau der p-Hydroxybenzoesäure in die Hydrochinonkomponente des Arbutins folgerte ZENK (1964b), daß die Überführung der p-Cumarsäure in p-Hydrochinon über eine oxydative Decarboxylierung verläuft. Eine Hydroxylgruppe verdrängt die Carboxylgruppe, die als Kohlendioxid abgespalten wird.

Auch wird die Ligninbildung aus den Ligninalkoholen nach der Vorstellung von FREUDENBERG (1962) durch Oxydation mit Phenolase bewirkt, wie dies in 1.21 beschrieben ist.

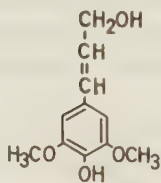
1.21 Ligninbildung und Ligninabbau durch Mikroorganismen

Das Lignin der lebenden Pflanzen ist ein Polymeres, das durch Oxydation verschieden methoxylierter Vinylalkohol-Monomeren entsteht. Coniferenlignin sowie das Lignin anderer Spezies entsteht vornehmlich durch Oxydation des Coniferylalkohols. Sinapinalkohol, als Bestandteil des Lignins der Laubbölzer, kommt nur vergesellschaftet mit Coniferylalkohol vor. Ein Mischpolymerisat des p-Cumaralkohols mit den anderen beiden Ligninalkoholen stellt das Lignin der Gramineen dar (de STEVENS und NORD 1953). In p-Stellung zur Vinyl-Alkohol-Seitenkette

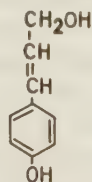
ist der Phenylring dieser Ligninalkohole durch eine freie Hydroxylgruppe substituiert; außerdem können eine oder zwei Methoxylgruppen in o-Stellung zur Hydroxylgruppe vorhanden sein.



Coniferyl -



Sinapin -



Cumar - alkohol

Abb. 4: Monomere Bausteine des Lignins

In Makromolekül des Lignins sind nach Untersuchungen von FREUDENBERG (1962, 1964) sowie KRATZL und BILLEK (1956) die einzelnen monomeren Phenylpropaneinheiten durch Äther- und/oder durch Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zusammengefügt. Die verschiedenen Bindungsarten werden beim Abbau des Lignins durch Mikroorganismen und beim chemischen Abbau des Lignins gespalten.

daß die genannten Phenolcarbonsäuren nur in geringer Menge frei vorliegen, sondern vielmehr adsorptiv gebunden oder umgewandelt sind. Eine Ausnahme bildet dabei die p-Hydroxybenzoesäure. Von der insgesamt in den Sproß aufgenommenen Aktivität war 25 % mit Aether extrahierbar, die ausschließlich in der p-Hydroxybenzoesäure-Bande lokalisiert war. Auffallend war dabei, daß dieser Befund nur für den Sproß zutraf, während sich im Aetherextrakt der Wurzel wie bei der Vanillin- und Syringasäure chromatographisch keine freie Säure auffinden ließ.

Bei der Charakterisierung der Methanolextrakte mittels der Dünnschichtchromatographie und UV-Spektroskopie sowie durch Messung der Aktivität in den Eluatn der einzelnen Banden der Chromatogramme zeigte sich, daß die Aktivität der aufgenommenen p-Hydroxybenzoesäure sich im Sproß zu 50,9 % und in der Wurzel zu 56,8 % in dieser Verbindung befand. Für Vanillinsäure ergaben sich die Werte: im Sproß 27,4 % und in der Wurzel 26,8 % und für Syringasäure im Sproß 18,4 % und in der Wurzel 36,5 %.

Neben diesen Banden wiesen die Startflecke sowie bei den mit p-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure behandelten Pflanzen im Wurzelextrakt die entsprechenden Methylesterbanden der nicht hydrolysierten Extrakte Aktivität auf. Nach der Hydrolyse der eluierten Startflecke von Chromatogrammen nicht hydrolysierter Sproß- und Wurzelextrakte mit 2 n H_2SO_4 traten bei nochmaliger Chromatographie neben den Banden der applizierten Phenolcarbonsäuren die Methylesterbanden dieser Verbindungen auf. Die Methylester wurden bei einer Hydrolyse mit 6 n HCl weitgehend verseift. Daraus konnte zunächst geschlossen werden, daß die Phenolcarbonsäuren und ihre Ester in der Pflanze in glycosidisch gebundener Form vorliegen.

In den unter 3.223 beschriebenen Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, daß die Bildung der Methylester eine Folge

der Extraktion mit Methanol war. Wie gezeigt wurde, lagen die Methylester ursprünglich als Glucoseester in der Pflanze vor und entstanden durch Extraktion mit Methanol durch eine Umesterung. Die Umesterung verlief aber nicht quantitativ. Im Methanolextrakt der Pflanzen konnte neben den Methylestern und freien Säuren noch ein Großteil der Aktivität im Startfleck nachgewiesen werden. Nach der Hydrolyse des Startflecks mit 2 n H_2SO_4 wurde weiterer Methylester sowie freie Säure freigesetzt. Da die Methylester durch eine Umesterung der Glucoseester entstehen, spricht dieses Ergebnis dafür, daß auch die Glucoseester der Phenolcarbonsäuren, teilweise oder vollständig, als Glucoside vorliegen. Im Methanolextrakt von Pflanzen, denen p-Hydroxybenzoesäure appliziert worden war, konnte neben dem Methylester noch p-Hydroxybenzoylglucose nachgewiesen werden.

Ebenso ergab die enzymatische Hydrolyse der Methanolextrakte mittels einer β -Glucosidase, die sowohl Glucoside als auch die Glucoseester spaltet, daß auf den Chromatogrammen neben den Phenolcarbonsäuren die Methylester als aktive Verbindungen auftraten. Da die Methylester in der Pflanze als Glucoseester vorlagen, ergab dieser Befund ebenfalls, daß auch die Glucoseester in der Pflanze z.T. glucosidisch gebunden waren.

Nach diesen Befunden waren in den Methanolextrakten von Pflanzen, die eine Zugabe von Carboxyl- ^{14}C -markierter p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure bzw. Syringasäure zur Nährlösung erhielten, die applizierten Verbindungen, die Glucoseester und Glucoside dieser Verbindungen als auch die Glucoseester-Glucoside der Phenolcarbonsäuren als markierte Substanzen nachweisbar. Es traten keine weiteren markierte, niedermolekulare Umwandlungsprodukte dieser Phenolcarbonsäuren nach der Aufnahme und Translokation in den Pflanzen auf.

Diese Ergebnisse stehen mit Untersuchungen von EL-BASYOUNI, CHEN, IBRAHIM, NEISH und TOWERS (1964) in Einklang, die nach

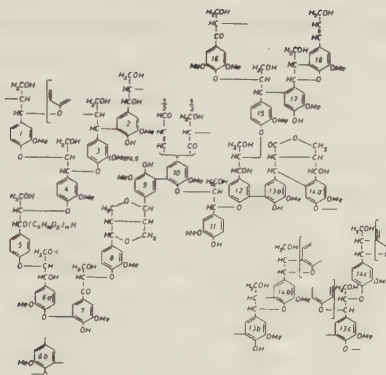


Abb. 5: Strukturschema von Lignin (FREUDENBERG 1962, 1964)

Der Abbau des Lignins bei der Verrottung pflanzlicher Substanz im Boden führt nach FLAIG (1960) und anderen Autoren zu phenolischen Spaltstücken, die als Ausgangsmaterial für die Bildung der Huminstoffe angesehen werden. Der Abbau durch Pilze verläuft wahrscheinlich in grundsätzlich ähnlicher Weise wie der Ligninabbau bei der Holzerstörung (HAIDER, LIM und FLAIG 1964; LIM 1965).

Während nur einzelne Mikroorganismen bei der Holzerstörung wirksam sind, haben im Boden eine Vielzahl von Mikroorganismen am Ligninabbau teil. Bisher können mit Sicherheit nur Hymenomyceten den Abbau des Lignins durchführen und unter anaeroben und besonderen thermischen Bedingungen evtl. auch Bakterien (siehe dazu HAIDER, LIM und FLAIG 1964).

Die aus dem Abbau resultierenden Spaltstücke des Lignins wurden aus Pflanzenmaterial unterschiedlicher Herkunft von HENDERSON (1955), MAEDER (1960), ISHIKAWA, SCHUBERT und NORD (1965) sowie von SEIFERT (1962) identifiziert. Einen Überblick über die Zahl und Struktur der bisher gefundenen phenolischen Spaltstücke des Lignins gibt folgende Abbildung.

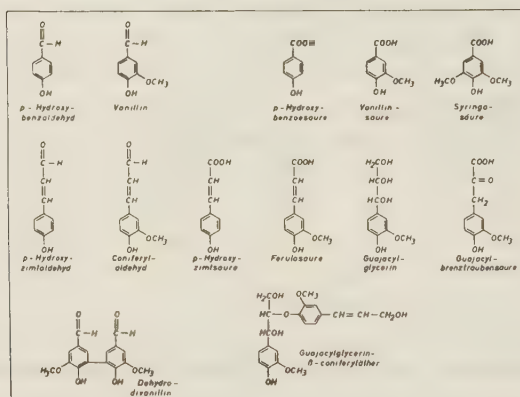


Abb. 6: Struktur der bisher gefundenen Spaltstücke des Lignins nach HAIDER, LIM und FLAIG (1964)

2. Untersuchungsmethoden

2.1 Anzucht und Aufbereitung des Pflanzenmaterials

Bei den Untersuchungen über die Aufnahme von Ligninspaltstücken war es notwendig, die Pflanzen unter völlig sterilen Bedingungen anzuziehen. In den letzten Jahrzehnten hatte man sich mehrfach mit diesem Problem beschäftigt, jedoch stieß man immer wieder auf unerwartete Schwierigkeiten, die es notwendig mach-

ten, die Methodik zu vervollständigen und entsprechend den gestellten Forderungen abzuändern.

Die Methoden der Sterilkultur unterteilen sich in zwei Gruppen:

1. Eine Anzucht der Pflanzen, bei der sowohl die ober- als auch die unterirdischen Teile steril gehalten werden. Wie aus der Literatur bekannt ist, eignet sich diese Methode ohne besondere aufwendige Apparatur nur für kleine Pflanzen (TANAKA 1931), insbesondere aber für kleine Wasserpflanzen wie Lemna und Spirodella (CLARK und ROLLER 1951).
2. Anzuchtmethoden, wobei nur das Wurzelsystem steril heranwächst, die oberirdischen Teile jedoch frei im Luftraum verbleiben. Den Vorteilen einer größeren Ähnlichkeit mit natürlichen Verhältnissen stehen die Nachteile einer viel größeren Infektionsgefahr gegenüber. Die Abtrennung des Wurzelraumes erfolgt mittels einer Schutzschicht, die aus den verschiedensten Materialien besteht. WEISSFLOG (1933) verwendet gepulvertes Kieselgel, GERRETSEN (1935) paraffinierte Korkkörner, während in einer neueren Arbeit SCHEFFER, KICKUTH und LORENZ (1965) den Wurzelraum mit einem sterilen Wattebausch gegen Infektion abschirmen.

Da es bei den Untersuchungen zur Aufnahme von ^{14}C -markierten Phenolcarbonsäuren notwendig war, unter völlig sterilen Kulturbedingungen zu arbeiten und gleichzeitig das von den Pflanzen veratmete evtl. markierte CO_2 quantitativ abzuführen und aufzufangen, wurde für die Anzucht der Testpflanzen ein im folgenden näher beschriebenes Verfahren entwickelt.

2.11 Sterilisation der Samenkörner

Die für die Sterilisation zusammengestellte Apparatur (abgeändert nach WELTE und TROLLDENIER 1962) wurde zunächst im Autoklaven sterilisiert. Die in der Abbildung 7 dargestellte

Apparatur war um ein Stativ angeordnet, so daß sie als Ganzes sterilisiert werden konnte.

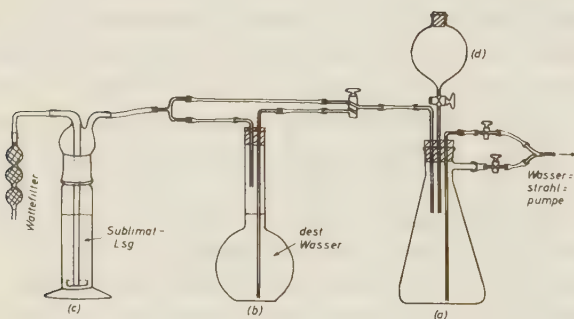


Abb. 7: Schematische Darstellung der Apparatur zum Sterilisieren der Samen (nach WELTE und TROLLENIER 1962)

Unbeschädigte, von Hand verletzte Sommerweizenkörner Sorte: Heines Koga wurden in einem Gazebeutel in die als Sterilisiergefäß vorgesehene Absaugflasche a gebracht. Nach dem Anschließen an eine Wasserstrahlpumpe wurde aus dem Stehkolben b steriles destilliertes Wasser in die Absaugflasche a gesaugt und damit die Körner überschichtet. Die dabei in die Apparatur einströmende Luft passierte ein Wattefilter und perlte durch eine 0,2 %ige Sublimatlösung in der Waschflasche a, so daß jegliche Gefahr einer Infektion ausgeschlossen war. Durch Schließen der entsprechenden Hähne wurden die anhaftenden Luftbläschen von den Körnern durch Anlegen eines leichten Vakuums innerhalb von 4-5 Stunden entfernt. Das Wasser in der Absaugflasche a wurde über die Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Darauf

erfolgte die Oberflächensterilisation der Samen mit einer 0,1 %igen Sublimatlösung mit einem Zusatz von 0,1 % Saponin (E. Merck, Darmstadt), die aus dem Trichter d in die Absaugflasche gelassen wurde. Die Sterilisation erfolgte 15 Minuten bei Unterdruck.

Das in den Versuchen zur Sterilisation der Samen verwendete 1 %ige Bromwasser, wie es von WELTE und TROLLENIER (1962) angegeben wurde, hatte entweder eine erhebliche bzw. vollständige Hemmung der Keimung zur Folge, oder bei kürzeren Einwirkungszeiten war der Sterilisationseffekt ungenügend.

Nach Absaugen der Sublimatlösung wurden die Samen mehrmals mit sterilem Wasser, das aus dem Stehkolben b in das Sterilisiergefäß gesaugt wurde, gespült.

2.12 Anzucht der Weizenpflanzen

Die oberflächensterilisierten Samen wurden in einer Impfkammer auf Agar-Platten (6 Korn je Petrischale) ausgelegt und bei 25°C im Brutschrank zum Keimen gebracht. Der verwendete Agar, der als Sterilisationskontrolle diente, hatte folgende Zusammensetzung: Fleischextrakt 0,3 %, Pepton 0,5 %, Agar 2 %. Der Nährboden wurde mittels Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt. Wenn die steril gekeimten Sämlinge eine Wurzellänge von ca. 1 cm hatten, wurden sie unter sterilen Arbeitsbedingungen in der Impfkammer auf Knop'sche Nährlösung übergesetzt. Ein eventueller Mikroorganismenbefall der einzelnen Samen machte sich auf den Agar-Platten bemerkbar. Diese Körner wurden nicht für die weiteren Versuche verwendet.



Abb. 8: Gekeimte Samen auf Agar-Platten.

Die weitere Anzucht erfolgte in Glasröhrchen von 8 cm Höhe und 2 1/2 cm Durchmesser. Ein am oberen Ende zum Haken gebogener dünner Glasstab hing über dem Rand des Glasröhrchens in das Gefäß hinein und war an seinem unteren Ende gabelförmig verzweigt. Die Gabel war im rechten Winkel abgebogen. Die Länge des Glasstäbchens war so gewählt, daß die gabelförmige Verzweigung geringfügig in die auf 15 ml bemessene Knop'sche Nährlösung eintauchte. Mit einer abgeflammt Pinzette wurden die Keimlinge auf die Glasgäbelchen in den Anzuchtgefäßen gebracht. Um bei einer evtl. Infektion die Verluste an Pflanzenmaterial so niedrig wie möglich zu halten, erfolgte die Anzucht einer jeden Pflanze einzeln. Nährlösung und Kulturgefäße wurden zuvor im Autoklaven bzw. Trockenschrank sterilisiert. Die bepflanzen Röhrchen (30 Stück) wurden in sterilisierte Exsikkatoren gestellt, die mit über Wattefilter sterilisierter Preßluft belüftet wurden. Der Preßluftstrom war so bemessen, daß 1 Liter Luft pro Minute und Anzuchtglocke umgesetzt wurde.

Vor dem Einleiten der Preßluft in die Anzuchtglocken wurde sie durch mit 50 %iger Schwefelsäure beschickte Waschflaschen geleitet, um eine gleichmäßige Verteilung der Preßluft zu gewährleisten und um zusätzlich mittels der Konzentration der vorgelegten Schwefelsäure die Luftfeuchtigkeit in den Anzuchtglocken zu regulieren. Die abzuführende Luft wurde durch eine 1 n Natronlauge geleitet, um das von den Pflanzen veratmete CO_2 aufzufangen. Dies war vor allem bei Arbeiten mit markierten Verbindungen wichtig. Einen Überblick über die Anzuchtgefäße und über die Versuchsanordnung geben die folgenden Abbildungen.

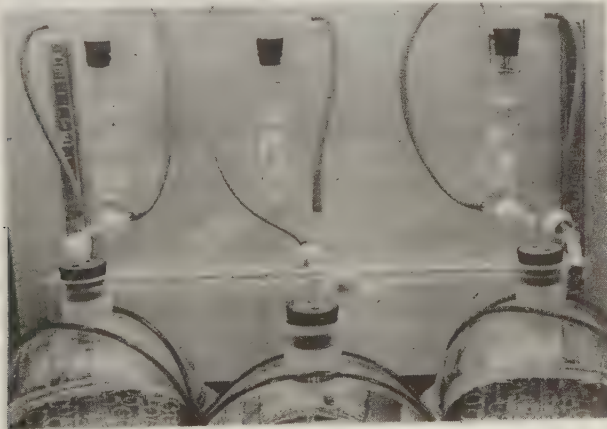


Abb. 9: Anzuchtglocken

Die Anzuchtglocken wurden mit Leuchtstoffröhren (Osram L 65 W/31 R mit Reflexschicht) 14 Stunden/Tag im Abstand von Lichtquelle zu Pflanze = 50 cm belichtet. Die Lichtintensität war zur Anzucht der Versuchspflanzen ausreichend. Die Temperatur lag bei $+ 16^{\circ}\text{C}$.

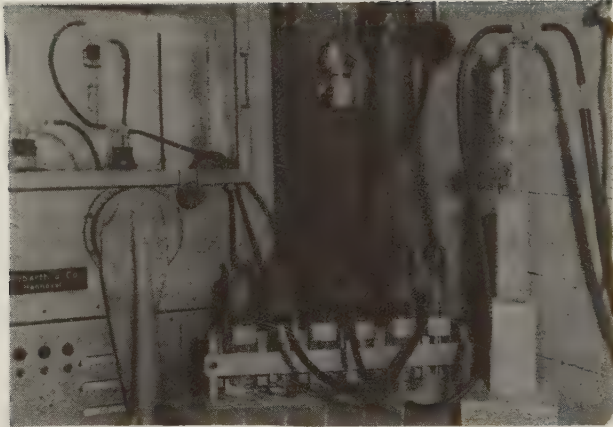


Abb. 10: Anlage zum Auffangen des von den Pflanzen veratmeten Kohlendioxids.

Je nach Versuchsfrage wurde den Pflanzen nach einigen Tagen (3-7 Tage) 1 ml einer in Wasser gelösten Phenolcarbonsäure in entsprechender Konzentration verabfolgt. Es war dabei wichtig, daß keine Verletzungen der Wurzeln erfolgte, daher wurde die Phenolcarbonsäure-Lösung durch eine in die Nährlösung eingetauchte Pipette zugegeben und durch vorsichtiges Einblasen von steriler Preßluft mit der Knop'schen Nährlösung vermischt. Gleichzeitig wurde mit der Impföse ein Ausstrich von den Nährlösungen auf Agar-Platten gemacht, um auf Sterilität zu prüfen.

2.13 Aufbereitung des Pflanzenmaterials

Bei der Aufbereitung des Pflanzenmaterials in den Vorversuchen mit nichtmarkierten Phenolcarbonsäuren wurde nach folgendem Schema verfahren:

Die geernteten Pflanzen wurden zunächst gründlich mit Leitungswasser bzw. Aqua dest. gespült. Danach wurden sie in Sproß und Wurzel getrennt, etwas zerkleinert und in Plastikschaalen in der

Tiefkühltruhe vorgefroren, um dann 36 Stunden gefriergetrocknet zu werden. Das so behandelte Pflanzenmaterial wurde im Degussitmörser mit Quarzsand zerrieben, mit 2 n Salzsäure in 250 ml Rundkolben überspült und für 12 Stunden unter Rückflußkühlung hydrolysiert. Das gesamte Hydrolysat wurde durch eine Extraktionshülse filtriert und der Rückstand weitere 12 Stunden mit Wasser im Soxhlet extrahiert. Der saure, wässrige Auszug wurde auf ca. 20 ml eingeeengt und im Kutscher-Steudel mit Aether erschöpfend extrahiert. Die Aetherlösung wurde auf 1 ml eingeeengt und chromatographisch analysiert.

Dieses für die Vorversuche angewendete Aufarbeitungsschema wurde für die spezielle Untersuchung mit markierten Verbindungen entsprechend abgewandelt und verfeinert. Die Aufarbeitung dieser Pflanzenmaterialien wird bei den einzelnen Untersuchungen beschrieben.

2.14 Nachweis der Phenolcarbonsäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Beim Nachweis und bei der Isolierung von Phenolen und Phenolderivaten spielt die Chromatographie augenblicklich wohl die bedeutendste Rolle. In den einschlägigen Fachbüchern der Papierchromatographie wurde die Technik sowie die Zusammensetzung der Laufmittel für die Abtrennung von Phenolen und Phenolderivaten eingehend beschrieben. Die Isolierung der interessierenden Phenole und Phenolcarbonsäuren mit Hilfe der Papierchromatographie wurde in den Arbeiten von IBRAHIM und TCWERS (1959, 1960) sowie von BÖRNER (1955) dargestellt.

Die Trennung der in Frage kommenden Phenolcarbonsäure mit Hilfe der Papierchromatographie war aber nicht sauber genug. Diese Schwierigkeit ließ sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie umgehen. Darüber hinaus konnte diese Methode für präparative Trennungen und quantitative Arbeiten verwendet werden. So be-

saß sie gegenüber der Papierchromatographie den Vorteil, daß man die 5-fache Substanzmenge auf gleicher Fläche auftrennen konnte. Die Laufzeit der Chromatogramme war wesentlich kürzer bei gleicher Trennwirkung. Die Dünnschicht-Chromatogramme waren der Dokumentation durch Autoradiographie und Photographie gut zugänglich. In einer eingehenden Untersuchung über die Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Ligninchemie berichteten KRATZL und PUSCHMANN (1960) über die vielseitigen Möglichkeiten der Anwendung dieser Methode.

Die Aetherextrakte wurden neben den jeweiligen Testsubstanzen bandförmig auf Kieselgelplatten von 1 mm Schichtdicke aufgetragen und zweimal in derselben Laufrichtung entwickelt.

Laufmittel: Wassergesättigter n-Dibutyläther: Eisessig (10:1)
bzw. Benzol: Dioxan: Eisessig (90:25:4).

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden auf Kieselgelplatten (Merck GF. 254) im zweidimensionalen Chromatogramm 10 bis 12 phenolische Substanzen im Pflanzenextrakt nachgewiesen, wovon Vanillinsäure, p-Hydroxybenzoesäure und Syringasäure identifiziert wurden. Bei der Untersuchung der Pflanzenextrakte erwies es sich als günstiger, nicht zweidimensional, sondern eindimensional, aber mit mehrfacher Entwicklung in einer Richtung zu arbeiten.

2.15 Nachweis von Phenolcarbonsäuren durch UV-Spektroskopie

Eine große Anzahl von Ligninspaltstücken ist zu ihrer Charakterisierung mit Hilfe der Ultraviolett-spektroskopie von AULIN-ERDTMAN (1950) untersucht worden. Eine spezielle Kennzeichnung der Phenolcarbonsäuren bzw. -aldehyde durch UV-Spektren gibt SÖCHTIG (1961). Sie besitzen ein für die jeweilige Substanz charakteristisches Spektrum im ultravioletten Bereich. Mit Meßlösungen bekannter Konzentration wurden Eichkurven für die einzelnen Substanzen in den jeweiligen Extinktionsbereichen

aufgestellt. Auf diese Eichkurven wurden die Lösungen unbekannter Konzentration bezogen. Die Messung erfolgte dabei in methanolischer Lösung. Zur Bestimmung der Konzentration an Phenolcarbonsäuren in den Nährlösungen wurden diese Messungen in Knop'scher Nährlösung unter Zusatz von 1 ml Acetatspuffer pH 6 durchgeführt.

In der folgenden Abbildung werden die Spektren verschiedener Phenolcarbonsäuren in Methanol wiedergegeben.

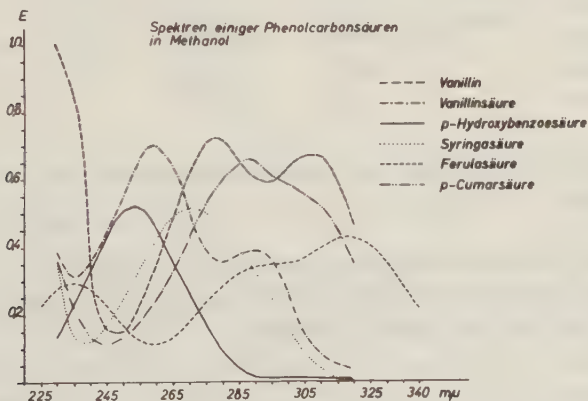


Abb. 11: Spektren einiger Phenolcarbonsäuren in Methanol

In Tabelle 2 sind die Extinktionsmaxima in $m\mu$ und Extinktionen bei diesen Wellenlängen zusammengefaßt.

Tabelle 1

Extinktionsmaxima in m/ μ und Extinktionen verschiedener Phenolcarbonsäuren in Methanol

Phenolcarbonsäure bzw. -aldehyd	Konz. in $\mu\text{g/ml}$	1.Max. m/ μ	Extinktion	2.Max. m/ μ	Extinktion
Vanillin	10	278	0,718	308	0,663
Vanillinsäure	10	259	0,702	289	0,388
p-Hydroxybenzoesäure	5	253	0,521		
Syringasäure	10	270	0,518		
Ferulasäure	5	293	0,350	317	0,430
p-Cumarsäure	5	288	0,661		

2.2 Synthese der markierten Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren

Die in der Arbeit verwendeten markierten Verbindungen wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. K. Haider zur Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt.

Die Synthese der Carboxyl- ^{14}C -markierten p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Syringasäure wurde nach einem von KRATZL und BILLEK (1953, 1954) beschriebenen Verfahren durch Umsetzung von geeigneten organischen Lithiumverbindungen mit $^{14}\text{CO}_2$ durchgeführt. Abb. 12 zeigt eine Darstellung dieses allgemeinen Verfahrens.

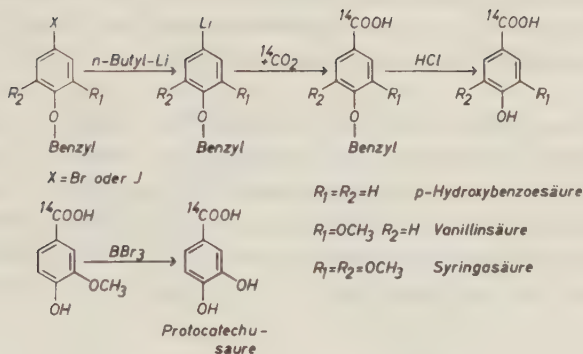


Abb. 12: Schema zur Synthese von Carboxyl-markierten Phenol-carbonsäuren

Die Synthese der Methoxyl- ^{14}C -markierten Verbindungen ist bei HAIDER, LIM und FLAIG (1962) und HAIDER und LIM (1965) beschrieben.

Durch Umsetzung von 3-Hydroxy-4-benzyloxy-benzoesäuremethylester mit ^{14}C -markiertem Methyljodid zu Benzylvanillinsäuremethylester und anschließender Verseifung mit alkoholischer Natronlauge zu Benzylvanillinsäure wurde durch weitere Hydrolyse mittels alkoholischer HCl die Methoxyl ^{14}C -markierte Vanillinsäure dargestellt.

Die Synthese der Methoxyl ^{14}C -markierten Syringasäure verläuft über die Trimethoxybenzoesäure, die nach dem beschriebenen Verfahren durch Umsetzung von Gallussäuremethylester mit ^{14}C -markiertem Methyljodid dargestellt wurde. Die partielle Demethylierung der Trimethoxybenzoesäure zu Syringasäure erfolgte nach einem von BOGERT und COYNE (1929) beschriebenen Verfahren durch Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure.

Die Kondensation eines Aldehyds wie p-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin oder Syringaaldehyd mit Malonsäure durch eine Knoevenagel-Synthese in Pyridin und Piperidin konnte sowohl zur Synthese von Methoxyl ^{14}C -markierten als auch zur Synthese der in 1-, 2-, oder 3-Stellung der Seitenkette markierten Phenolacrylsäuren angewendet werden.

Die Einführung des markierten Kohlenstoffs in die 3-Stellung der Seitenkette erfolgte durch Kondensation eines in der Aldehydgruppe ^{14}C -markierten Aldehyds mit nichtmarkierter Malonsäure, während die Markierung der 2- bzw. 1-Stellung der Seitenkette durch Kondensation von mittelständig-bzw. Carboxyl-markierter Malonsäure mit dem inaktiven Aldehyd erfolgte.

Die Synthese der ringmarkierten Benzoesäure ist bei HAIDER (1966) beschrieben. Sie geht von $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ aus, das über Acetylen in Benzol überführt wird.

Die spezifische Aktivität der markierten Verbindungen betrug durchschnittlich 1 m C/m Mol. In den Pflanzenversuchen wurden diese Verbindungen mit den entsprechenden nichtmarkierten Säuren verschnitten.

2.3 Methoden bei den Versuchen mit ^{14}C -markierten Phenolen

2.31 Überführung der Proben in Kohlendioxid und in Bariumcarbonat durch Oxydation mit der Apparatur nach Schmid und Schmid

Die Apparatur von SCHMID und SCHMID (1953) ist zur quantitativen Bestimmung des Kohlenstoffs in Form von BaCO_3 geeignet. Sie wurde hier meist nur zur Bestimmung des Gehaltes an Radiokohlenstoff verwendet.

Zur Messung der ^{14}C -Aktivität wurde die gefriergetrocknete Pflanzentrockenmasse oder die eluierten Substanzen und ihre

Umsetzungsprodukte mit Hilfe der von VAN SLYKE und Mitarbeiter (1951) angegebenen Methoden naß oxydiert und in Kohlendioxid bzw. Bariumcarbonat überführt. Für diese Oxydation wurde die von SCHMID und SCHMID (1953) angegebene Apparatur verwendet.

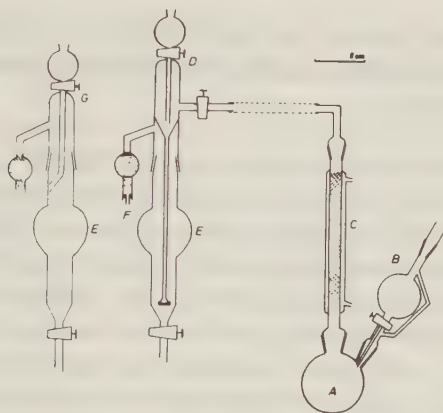


Abb. 13: Apparatur für die nasse Oxydation nach SCHMID und SCHMID

Die zu oxydierende Substanz (5-7 mg Kohlenstoff) wurde in das Kölbchen A eingewogen und mit ca. 500 mg eines Gemisches aus KJO_3 und $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1:7) versetzt. Im Trichter B befanden sich 10 ml eines Gemisches aus H_2SO_4 (30 % Anhydrid), H_3PO_4 und KJO_3 (50 ml H_2SO_4 , 50 ml 35 %ige H_3PO_4 und 1,5 g KJO_3). Durch Erzeugung eines Unterdrucks bei F wurde CO_2 -freie Luft über B durch die Apparatur gesaugt und perlte langsam durch etwa 100 ml Natronlauge (0,5 % NaOH) in E.

Nach Zugabe der Oxydationslösung wurde das Reaktionsgemisch im Kolben A mit schwacher Flamme zum leichten Sieden erhitzt. Evtl. SO_3 -Dämpfe wurden durch die Zinkgrießfüllung im Kühler C zurückgehalten. Bis zum Abkühlen wurde weiterhin Luft durchgesaugt und dann der Aufsatz D gegen den Aufsatz G ausgewechselt. Mit einer 25 %igen Ammoniumchloridlösung wurde die Natronlauge abgepuffert und anschließend mit einer 25 %igen

BaCl₂-Lösung das Carbonat gefällt. Das ausgefallene Bariumcarbonat wurde nach ca. 30 Minuten in eine gewogene Fritte filtriert, mit kohlendioxidfreiem Wasser und Methanol gewaschen und abschließend bei 105°C getrocknet und ausgewogen.

2.32 Überführung der Proben in Kohlendioxid und in Bariumcarbonat durch Oxydation mit der Mikro-Verbrennungsapparatur nach Schöniger

Im Gegensatz zur Apparatur nach SCHMID und SCHMID, bei der feucht verascht wird, erfolgt hier eine Verbrennung der organischen Substanzen in einer Sauerstoffatmosphäre. Die Apparatur besteht aus einem Schrank und dem eigentlichen Verbrennungskolben mit speziellem Schliffstopfen. Am Schliffstopfen befindet sich zur Halterung der zu verbrennenden Probe ein Drahtkörbchen und der zur elektrischen Zündung notwendige Heizfaden. Alle innerhalb des Kolbens befindlichen Metallteile, also das Drahtkörbchen, der Heizfaden und die Zuleitungen sind aus einer Platinlegierung gefertigt.

Die zu verbrennende Pflanzenprobe (5-8 mg Trockensubstanz) wurde in kleine gefaltete Papiertütchen aus aschefreiem Papier eingewogen. Lösungen und Extrakte, die verbrannt werden sollten, wurden auf Papierfähnchen aufgetragen und mit dem Föhn das Lösungsmittel abgedampft. Diese Proben wurden zwischen die Halterung des Drahtkörbchens geklemmt und die Papierzunge an dem jeweiligen Papiertütchen oder -fähnchen zwischen die Heizschlinge gesteckt. In den Verbrennungskolben wurden 50 ml einer ca. 1 %igen Natronlauge gegeben und anschließend wurde er mit Sauerstoff gefüllt. Der Kolben wurde dann mit dem Schliffstopfen nach unten in eine Fassung am Schrankboden gesteckt und durch elektrischen Strom der Heizfaden zum Glühen gebracht, der das Papierfähnchen entzündete. Die Verbrennung dauerte nur wenige Sekunden. Im Kolben wurde anschließend das CO₂ durch längeres Schütteln

in der NaOH absorbiert. Die Natronlauge wurde mit 5 ml 25 %iger Ammoniumchloridlösung gepuffert und mit 3 ml 25 %iger Bariumchloridlösung das absorbierte CO_2 als Bariumcarbonat gefällt. Die weitere Handhabung des Niederschlags ist unter 2.33 beschrieben.

2.33 Messung der Radioaktivität des Bariumcarbonats

Die Messungen wurden in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler der Firma Packard (Modell Tricab Series 314 A) durchgeführt. Das Meßgerät war so eingestellt, daß für Radiokohlenstoff die höchste Ausbeute erreicht wurde. Etwa 40 mg Bariumcarbonat wurden in die Meßgläschen eingewogen und mit 500 mg eines thixotropen Gels der Firma Packard (Thixotropic Gel Powder Cab-O-Sil) sowie 20 ml der Scintillatorlösung (4 g Diphenyloxazol und 0,1 g Di (-Phenyloxazoly)- benzol in einem Liter Toluol gelöst) versetzt. Durch Bestimmung der nach dieser Methode gemessenen Impulszahl eines Bariumcarbonats, das durch Oxydation eines ^{14}C -Benzoessäure-Standards mit 5000 Zerfällen/ $\text{mg}/\text{min.}$ gewonnen worden war, wurde die radiometrische Ausbeute dieser Methode bestimmt; sie betrug 56 % der wahren Zerfälle.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der eingesetzten Vanillinsäure bzw. der Umwandlungsprodukte wurden aliquote Teile der Substanzen direkt in der Scintillatorlösung gelöst und gemessen. Mit einem direkt gemessenen ^{14}C -Benzoessäurestandard und der Impulszahl des aus ihm durch Verbrennung erhaltenen Bariumcarbonats war der Vergleich zwischen der direkten Messung der Substanzen in Form von Bariumcarbonat möglich.

2.34 Messung der ^{14}C -Aktivität auf Chromatogrammen

Die Messung der ^{14}C -Aktivität auf Papierchromatogrammen, Papierpherogrammen und Dünnschichtplatten erfolgte mit dem Gasdurchflußzählrohr TGC-14 der Firma Tracerlab. Die Apparatur wurde für die Aktivitätsbestimmung auf Papierchromatogrammen

entwickelt und erlaubt eine Streifenbreite des Papiers von 4,5 cm. Aus diesem Grunde wurden für die Messung der ^{14}C -Aktivität auf Dünnschichtplatten Glasplatten mit den Ausmaßen 4,5 x 30 cm mit Kieselgel von 1 mm Schichtdicke beschichtet, um auch für die Dünnschichtchromatogramme diese Apparatur verwenden zu können. Die radiometrische Ausbeute dieser Methode lag zwischen 1 - 3 %.

2.4 Synthese der 1-(p-Hydroxybenzoyl)- β -D-glucose

Die von FISCHER und BERGMANN (1919) beschriebene Synthese der p-Hydroxybenzoylglucose verläuft über das Pentaacetat dieser Verbindung. Ein Gemisch von 10 g Tetraacetyl- β -D-glucose (Organic Synthesis Vol. 25) und 6,5 g Acetyl-p-hydroxybenzoylchlorid (FISCHER und KADISADI 1919) wurde mit der Lösung von 4,1 g trockenem Chinolin in 20 ml Chloroform übergossen. Beim Umschütteln erfolgte bald Lösung und in der Regel scheiden sich nach einigem Stehen Kristalle ab. Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde durch Zusatz von Chloroform wieder gelöst, dann in der üblichen Weise mit verdünnter Schwefelsäure, Bicarbonat und Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck verdampft. Der wenig gefärbte, kristalline Rückstand wurde in 20 ml heißem Benzol gelöst und die beim Abkühlen eintretende Kristallisation durch Zusatz von etwas Petroläther vervollständigt. Zur völligen Reinigung löst man in der 5-fachen Menge warmen Acetons und fügt allmählich die halbe Menge kaltes Wasser zu. Ausbeute 13,8 g oder 94 % der Theorie. Schmp. 172-173°.

Die Verseifung des Pentaacetats erfolgte mit alkoholischer Natronlauge. 5 g fein gepulvertes Pentaacetat wurden in 50 ml Alkohol suspendiert und dazu unter Umschütteln bei Zimmertemperatur 1 ml wässrige 10 n - Natronlauge zugefügt. Im Laufe der nächsten halben Stunde wurden in 5 Portionen 50 ml Wasser hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde war die Verseifung beendet. Die p-Hydroxybenzoylglucose wurde als Bleisalz isoliert.

Man versetzt die alkalisch reagierende Lösung mit einer konzentrierten, wässrigen Lösung von 15 g Bleiacetat und fügt solange in kleinen Portionen konzentrierte Ammoniaklösung zu, bis sich der starke, farblose Niederschlag nicht mehr vermehrt. Jetzt wurde abgesaugt, mit schwach ammoniakalischem Wasser gewaschen, in 250 ml Wasser suspendiert und das Bleisalz durch Einleiten von Schwefelwasserstoff völlig zersetzt. Nach Zugabe von 150 ml Alkohol wurde bis zum Sieden erhitzt und das Bleisulfid abfiltriert. Beim Einengen des Filtrats auf 20 ml unter geringem Druck erfolgte Kristallisation. Ausbeute etwa 1,65 g oder 56 % der Theorie. Nach Umkristallisation aus 75 ml siedendem Wasser erhält man flache Nadeln vom Schmp. 228° (unter Braunfärbung und Aufschäumen).

3. Versuchsergebnisse

=====

3.1 Voruntersuchungen mit nichtmarkierten Verbindungen

Die ersten Untersuchungen wurden mit Pflanzenextrakten durchgeführt, die aus nicht steril angezogenen Kulturen erhalten worden waren. In diesem Falle war es nicht möglich, die Aufnahme des der Nährlösung zugesetzten Vanillins nachzuweisen, da diese Substanz wahrscheinlich von Mikroorganismen oxydiert wurde. Die Aufnahme anderer zugesetzter Phenolcarbonsäuren war fraglich, da bereits eine große Zahl von Phenolen durch die Pflanze selbst gebildet werden.

So entdeckten EL-BASYOUNI und TOWERS (1964) auf den Chromatogrammen von alkalischen und sauren Hydrolysaten des äthanolischen Extraktes aus Weizenpflanzen 43 phenolische Verbindungen. Viele dieser Substanzen konnten nur in einem bestimmten Wachstum- und Entwicklungsstadium festgestellt werden; außerdem variiert die Verteilung der phenolischen Verbindungen in den einzelnen Pflanzenorganen.

3.11 Vanillin

Bei Zugabe von Vanillin (100 $\mu\text{g/ml}$ Nährlösung) zur sterilen Nährlösung fand man nach 65 Stunden Inkubationszeit in den Wurzelorganen eine Anreicherung von Vanillin und Vanillinsäure. Erhöhte man die Menge des zugegebenen Vanillins von 100 auf 600 $\mu\text{g/ml}$ Nährlösung, so trat neben dem Vanillin und der Vanillinsäure eine Substanz stark vermehrt auf, von der anfänglich auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens vermutet wurde, daß es sich um p-Hydroxybenzoesäure handelt. Weitere Untersuchungen mit markierter Vanillinsäure ließen die Entstehung von p-Hydroxybenzoesäure aus Vanillin und Vanillinsäure aber fraglich erscheinen.

3.12 Vanillinsäure

Der Nährlösung zugegebene Vanillinsäure (100 $\mu\text{g/ml}$ Nährlösung) führte zur Anreicherung dieser Substanz in den Wurzeln. Nach einer 12-stündigen Hydrolyse mit 2 n Salzsäure des wässrigen Extraktes traten keine weiteren Phenolcarbonsäuren verstärkt auf. Wie in der Literaturübersicht bereits erwähnt, konnten auch WINTER, PREUSS und SCHÖNBECK (1959) nach der Aufnahme von Vanillinsäure durch die Wurzeln in der Pflanze außer Vanillinsäure keine weitere Substanz nachweisen. Bei Infiltrationsversuchen in Reisblattsegmente konnten EL-BASYOUNI, CHEN, IBRAHIM, NEISH und TOWERS (1964) zwar eine Methylierung der Protocatechusäure zu Vanillinsäure feststellen, jedoch wurde in diesem Prozeß keine Syringasäure gebildet. Bei Infiltration von Carboxyl- ^{14}C -markierter Vanillinsäure in Blattsegmente von vier Pflanzenspezies konnte nach der Hydrolyse außer in der Vanillinsäure selbst keine weitere Aktivität festgestellt werden (EL-BASYOUNI, CHEN, IBRAHIM, NEISH und TOWERS (1964)).

3.13 Syringasäure

Applizierte Syringasäure (100 $\mu\text{g/ml}$ Nährlösung) erbrachte nach

65 Stunden Inkubationszeit ebenfalls nur eine Anreicherung dieser Substanz in den Wurzelorganen.

Als Ergebnis der Untersuchungen mit nichtmarkierten Verbindungen zeigte sich, daß den Pflanzen in Nährlösung angebotenes Vanillin bzw. Vanillinsäure und Syringasäure von den Wurzeln aufgenommen wurden. Die verabfolgten Substanzen sowie deren Umwandlungsprodukte traten in den Wurzelextrakten der behandelten Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen verstärkt auf. Ob ein Transport der gefütterten Substanzen bis in den Sproß erfolgte, ließ sich aus den Untersuchungen mit nichtmarkierten Verbindungen nicht mit Sicherheit bestimmen.

3.14 Die Abhängigkeit der Aufnahme von Vanillinsäure von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung und der Luftfeuchtigkeit

SIMON und BEEVERS (1952) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß saure Verbindungen in dem pH-Bereich maximal aufgenommen werden, der ihrem pK-Wert entspricht. Dies wurde noch durch die Arbeiten von ZENK (1966) gestützt, der die Aufnahme von Zimtsäure, Salizylsäure u.a. in Pflanzengewebe in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung untersuchte.

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Vanillinsäure durch die Wurzel zu prüfen, wurden durch Zugabe von n/10 bzw. n/100 Schwefelsäure oder n/100 Natronlauge Knop'sche Nährlösungen auf pH-Werte von 2,5; 3,5; 4 und 5 eingestellt. Auch wurde ein Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit auf die Aufnahme in Betracht gezogen, da die Transpiration der Pflanzen von ihr beeinflusst wird. Durch Schwefelsäure und Wasser wurde in den Anzuchtglocken eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 % bzw. 100 % eingestellt.

Den jeweiligen Pflanzen einer Versuchsgruppe wurden 7 Tage nach dem Übersetzen auf die Knop'sche Nährlösung 200 µg Vanillin-

säure/ml Nährlösung zugesetzt. 65 Stunden nach der Zugabe der Vanillinsäure wurde der Versuch abgebrochen und die Vanillinsäurekonzentration in der Nährlösung mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Die Differenz zur zugegebenen Menge galt als Aufnahme durch die Pflanzen.

Das Ergebnis dieses Versuches wird in Abb. 14 wiedergegeben.

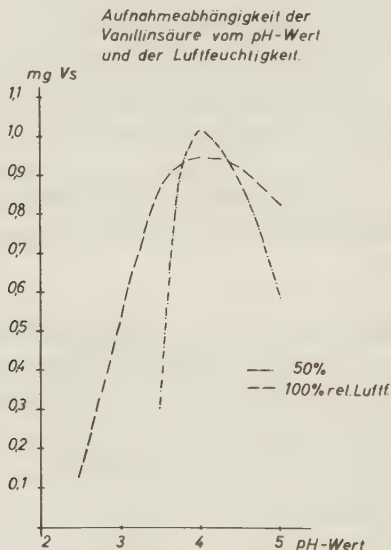


Abb. 14: Abhängigkeit der Aufnahme von Vanillinsäure vom pH-Wert der Nährlösung und der rel. Luftfeuchtigkeit

Es zeigte sich, daß bei diesem Versuch die maximale Aufnahme von Vanillinsäure bei einem pH-Wert der Nährlösung von 4 lag. Schon bei der Verschiebung um einen halben pH-Wert auf 3,5 fiel die Aufnahme um 70 % ab, während bei einer Verschiebung des pH-Wertes zum neutraleren Bereich auf pH 5 die Aufnahme um 40 % sank. Der pK-Wert der Vanillinsäure wurde zu 4,36 bestimmt. Die maximale Aufnahme der Vanillinsäure schien also

bei dem pH-Wert der Nährlösung zu erfolgen, der dem pK-Wert der zugeführten Substanz entsprach. Eine Verminderung der Luftfeuchtigkeit scheint zu einer Verengung und gleichzeitig zu einer Verstärkung des Aufnahmemaximums zu führen.

3.2 Untersuchungen mit markierten Verbindungen

3.21 Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme der Carboxyl-¹⁴C-markierten Vanillinsäure

Eine Untersuchung über die Abhängigkeit der Aufnahme der Vanillinsäure von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung wurde bereits mit inaktiver Vanillinsäure durchgeführt. Die unter 3.14 beschriebenen Ergebnisse, daß die maximale Aufnahme der Vanillinsäure bei dem pH-Wert der Nährlösung erzielt wurde, der dem pK-Wert dieser Substanz entsprach, sollten noch einmal mit markierter Vanillinsäure überprüft werden. Im Versuch 3.14 konnte die Aufnahmhöhe nur aus der Differenz zwischen der am Versuchsbeginn zugegebenen Menge an Vanillinsäure und der am Versuchsende gemessenen Vanillinsäurekonzentration in der Nährlösung indirekt ermittelt werden.

Durch den Einsatz markierter Vanillinsäure ließ sich die Aufnahme direkt verfolgen.

Die Pflanzen wurden unter den geschilderten sterilen Kulturbedingungen angezogen und das von den Pflanzen gebildete CO₂ in Intensivwaschflaschen in 1 n Natronlauge aufgefangen. Nach der Ernte wurden die Pflanzen in Sproß und Wurzel getrennt und im Zellhomogenisator (nach MERKENSCHLAGER, SCHLOSSMANN und KURZ (1957); Firma Braun, Melsungen) zerkleinert. Das wässrige Homogenisat wurde in Plastikschalen gefriergetrocknet und anschließend das Gewicht der Trockensubstanz bestimmt. Aliquote Teile der Wurzel- bzw. der Sproßtrockenmasse wurden zur Aktivitätsbestimmung einer nassen Oxydation unterworfen und die Aktivität als Bariumcarbonat gemessen. Das in der Natronlauge aufgefangene

ne, gebildete Kohlendioxid der Pflanzen wurde ebenfalls in aliquoten Anteilen als Bariumcarbonat gefällt und die Aktivität gemessen.

Die Nährlösungen wurden mittels $n/10$ bzw. $n/100$ H_2SO_4 auf die pH-Werte von 3,5 und 4,5 bzw. pH 5,5 eingestellt. Die Inkubationszeit betrug wiederum 65 Stunden. Der Nährlösung wurden $200/\mu g$ Vanillinsäure/ml zugesetzt. Die Carboxyl- ^{14}C -markierte Vanillinsäure wurde mit inaktiver Vanillinsäure verschnitten.

Für den Versuch wurden 104,80 mg Vanillinsäure in 36 ml H_2O gelöst, die eine spezifische Aktivität von 921489 Ipm/mg gemessen als $BaCO_3$ hatte. Von dieser Stammlösung wurden der Nährlösung jeder Pflanze 1 ml zugesetzt; d.h. 2,914 mg Vanillinsäure in 15 ml Nährlösung bzw. $194,3/\mu g$ Vanillinsäure pro Milliliter Nährlösung, entsprechend einer $1,15 \cdot 10^{-3}$ molaren Konzentration. Jede Pflanze erhielt somit $2,685 \cdot 10^6$ Ipm. gemessen als Bariumcarbonat.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 2

Aktivitätsverteilung und Vanillinsäureaufnahme pro Pflanze in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung

Nähr- lösung pH	Unter- suchungs- objekt	Imp/Pflanze	Aufnahme der zugesetzten Vanillinsäure		Verteilung der Aktivität in der Pflanze Gesamt = 100
			in %	in mg	
3,5	Wurzel	65274	2,43	0,071	63,45
	Sproß	7685	0,29	0,008	7,57
	freiges. CO ₂	29711	1,11	0,033	28,98
4,5	Wurzel	116742	4,35	0,127	59,18
	Sproß	10837	0,40	0,012	5,44
	freiges. CO ₂	69488	2,60	0,076	35,38
5,5	Wurzel	174114	6,49	0,189	71,16
	Sproß	6879	0,26	0,007	2,85
	freiges. CO ₂	63488	2,37	0,069	25,99

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte sich, daß die Aktivität der Vanillinsäure sowohl in der Wurzel als auch im Sproß vorhanden war und ein beträchtlicher Anteil als Kohlendioxid freigesetzt wurde. Die maximale Aufnahme in den Sproß erfolgte bei einem pH-Wert der Nährlösung von 4,5, während die Aufnahme in die Wurzel mit dem pH-Wert kontinuierlich anstieg. Die Ergebnisse standen im Einklang mit der Untersuchung zu diesem Problem, wie sie unter 3,14 beschrieben sind. Der bei pH 5,5 aufgetretene hohe Gehalt in der Wurzel kann durch Adsorption verursacht sein.

Die Tatsache, daß mit steigender Aufnahme von Vanillinsäure in den Sproß und in die Wurzel ein höherer Kohlendioxidanfall aus der markierten Verbindung parallel lief, ließ die Vermutung zu,

daß Vanillinsäure oder ihre Umwandlungsprodukte entweder einer Decarboxylierung oder einem vollständigen Abbau unterliegen. Die relativ hohe Vanillinsäurekonzentration in der Wurzel könnte darauf hindeuten, daß die Vanillinsäure in der Wurzel z.T. in sorptiver Bindung vorliegt.

3.22 Der Einfluß der Inkubationszeit und des Alters der Pflanzen auf die Aufnahme von Carboxyl-¹⁴C-markierte p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Syringasäure

Für diese Untersuchungen wurden eine größere Anzahl von Weizenpflanzen unter den bereits beschriebenen sterilen Kulturbedingungen angezogen. Durch verschieden lange Inkubationszeiten von 3 bzw. 6 Tagen sollte gleichzeitig der Einfluß der Einwirkungszeit und des Alters der Pflanzen auf die Aufnahme der Phenolcarbonsäuren sowie evtl. Umwandlungsprodukte, die sich von diesen Verbindungen ableiten, untersucht werden. Den einzelnen Pflanzen wurden

3,100 mg p-Hydroxybenzoesäure, entsprechend $1,532 \cdot 10^6$ Ipm gemessen als Bariumcarbonat, in 15 ml Nährlösung einer Molarität von $1,5 \cdot 10^{-3}$ entsprechend bzw.

3,0177 mg Vanillinsäure, entsprechend $2,803 \cdot 10^6$ Ipm gemessen als Bariumcarbonat, in 15 ml Nährlösung einer Molarität von $1,2 \cdot 10^{-3}$ entsprechend bzw.

3,027 mg Syringasäure, entsprechend $1,372 \cdot 10^6$ Ipm gemessen als Bariumcarbonat, in 15 ml Nährlösung einer Molarität von $1,06 \cdot 10^{-3}$ entsprechend

appliziert. Die Zugabe einer Verbindung wurde zu jeweils 30 Pflanzen vorgenommen. Nach 3 Tagen Inkubationszeit wurden 15 Pflanzen abgeerntet, nach weiteren 3 Tagen die restlichen 15 Pflanzen. Der pH-Wert der Knop'schen Nährlösung entsprach dem jeweiligen pK-Wert der zugesetzten Verbindung, der bei 4,5 lag.

Von der homogenisierten, gefriergetrockneten Pflanzenmasse wurden zunächst aliquote Anteile in der Schöniger Apparatur zu Kohlendioxid oxydiert und der aufgenommene Anteil sowie die Verteilung der betreffenden Phenolcarbonsäure über die Pflanzenorgane bestimmt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt.

Tabelle 3

Aktivitätsverteilung von p-Hydroxybenzoesäure pro Pflanze

Aktivität in	Ipm/Pflanze	Aufnahme der zugewetzten p-Hy- droxybenzoesäure		Verteilung der Aktivität in der Pflanze
		in %	in mg	Gesamt = 100
nach 3 Tagen Inkubationszeit				
Wurzel	75055	4,90	0,152	69,50
Sproß	24834	1,62	0,050	22,98
freiges. CO ₂	8072	<u>0,53</u>	<u>0,016</u>	7,52
		Sa.7,05	Sa.0,218	
nach 6 Tagen Inkubationszeit				
Wurzel	117960	7,70	0,239	66,72
Sproß	44325	2,89	0,090	25,04
freiges. CO ₂	14622	<u>0,95</u>	<u>0,030</u>	8,24
		Sa.11,54	Sa.0,359	

Tabelle 4

Aktivitätsverteilung von Vanillinsäure pro Pflanze

Aktivität in	Ipm/Pflanze	Aufnahme der zugesetzten Vanillinsäure		Verteilung der Aktivität in der Pflanze
		in %	in mg	Gesamt = 100
nach 3 Tagen Inkubationszeit				
Wurzel	157673	5,63	0,169	56,41
Sproß	27934	0,96	0,030	9,62
freigesetztes CO ₂	95048	<u>3,39</u>	<u>0,102</u>	33,97
		Sa.9,98	Sa.0,301	
nach 6 Tagen Inkubationszeit				
Wurzel	242974	8,67	0,262	51,52
Sproß	47744	1,70	0,051	10,10
freigesetztes CO ₂	181176	<u>6,46</u>	<u>0,195</u>	38,38
		Sa.16,83	Sa.0,508	

Aus der Verteilung der Aktivität in den Pflanzen war zu erkennen, daß von den insgesamt aufgenommenen Mengen an p-Hydroxybenzoesäure bzw. Vanillinsäure und Syringasäure ungefähr 70 % bzw. 55 % und 43 % in der Wurzel angereichert sind. Diese Mengen sind wahrscheinlich nicht allein als eine echte Aufnahme zu deuten, denn der sich in der Wurzel befindende Anteil ist gegenüber dem im Sproß verhältnismäßig hoch. Es wird vermutet, daß die Phenolcarbonsäuren in der Wurzel zum Teil in sorptiver Bindung vorliegen und bei der Ernte durch Abspülen mit warmen Wasser nicht entfernt werden können. Für die Berechnungen wurde jedoch die insgesamt in den Pflanzen bestimmte Aktivität als Aufnahme gewertet.

Tabelle 5

Aktivitätsverteilung von Syringasäure pro Pflanze

Aktivität in	Ipm/Pflanze	Aufnahme der zugesetzten Syringasäure		Verteilung der Aktivität in der Pflanze
		in %	in mg	Gesamt = 100
nach 3 Tagen				
Inkubationszeit				
Wurzel	48816	3,56	0,108	40,14
Sproß	16163	1,18	0,036	13,30
freigesetztes CO ₂	56614	<u>4,13</u>	<u>0,125</u>	46,56
		Sa.8,87	Sa.0,269	
nach 6 Tagen				
Inkubationszeit				
Wurzel	108243	7,89	0,239	45,93
Sproß	25020	1,82	0,055	10,59
freigesetztes CO ₂	102554	<u>7,47</u>	<u>0,226</u>	<u>43,48</u>
		Sa.17,18	Sa.0,520	

Je nach Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Aufnahme in den Sproß bei p-Hydroxybenzoesäure 1,6 - 2,9 %, bei Vanillinsäure 1 - 1,7 % und bei Syringasäure 1,1 - 1,8 % der zugesetzten Menge der betreffenden Phenolcarbonsäure.

Die Menge der insgesamt von der Pflanze aufgenommenen Säure betrug je nach Inkubationsdauer bei p-Hydroxybenzoesäure 7 - 12 %, bei Vanillinsäure 10 - 17 % und bei Syringasäure 9 - 17 % der applizierten Verbindungen.

Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis der Untersuchungen mit Carboxyl-¹⁴C-markierten Phenolcarbonsäuren ist der relativ hohe Anteil an aktivem Kohlendioxid, der von den Pflanzen freigesetzt wurde. Mit zunehmender Zahl am aromatischen Ring sub-

stituiertter Hydroxyl- und Methoxylgruppen läuft eine erhöhte Abspaltung von markiertem Kohlendioxid parallel. Während bei p-Hydroxybenzoesäure nur 7 - 8 % der markierten Carboxylgruppe in Form von Kohlendioxid auftrat, erhöhte sich dieser Anteil bei Vanillinsäure auf 35 % und bei Syringasäure auf ungefähr 45 %. Diese Befunde sind noch Gegenstand eingehenderer unter 3.3 beschriebener Untersuchungen über die Kohlendioxydabspaltung aus verschiedenen markierten Phenolcarbonsäuren.

Auffallend war weiterhin, daß trotz verschiedener Inkubationszeit und vermehrter Aufnahme die Relationen zwischen den Pflanzenorganen - (Wurzel-Sproß) - und dem freigesetzten CO_2 ungefähr konstant bleiben.

Die Differenz zwischen der Menge an Aktivität, die der Nährlösung pro Pflanze zugesetzt worden war, und der Menge, die nach Abbruch des Versuches in der Nährlösung wiedergefunden werden konnte, deckt sich annähernd mit der Aktivitätsmenge, die von den Pflanzen aufgenommen worden war. Eine chromatographische Untersuchung der Nährlösung nach der Durchführung des Versuches ergab, daß außer der applizierten Verbindung keine weiteren Substanzen nachzuweisen waren, die evtl. durch Wurzelausscheidungen oder durch Infektion der Nährlösung durch Mikroorganismen im Nährmedium hätten auftreten können.

3.221 Auftrennung der in der Pflanzensubstanz enthaltenen ^{14}C -Aktivität durch verschiedene Extraktionsmittel

Zur weiteren Charakterisierung und Auftrennung wurden die Pflanzentrockenmassen nacheinander einer Aether-, Methanol- und Wasserextraktion in einem Soxhlet-Apparat unterzogen. Die Extraktionsdauer betrug jeweils 12-15 Stunden. Die einzelnen Extrakte wurden am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeeengt und bis 10 ml mit dem jeweiligen Lösungsmittel wieder aufgefüllt. Aliquote Anteile der Extrakte wurden mit Hilfe der Schöniger Apparatur zu Kohlen-

dioxid oxydiert, in Bariumcarbonat überführt und die Aktivität bestimmt, um die Verteilung in den unterschiedlich polaren Lösungsmitteln zu untersuchen.

Die nachstehenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der Aktivitätsverteilung über die einzelnen Extrakte. Es wurden dabei die Pflanzen von dem in 3.22 geschilderten Versuch verwendet.

Tabelle 6

Verteilung der Aktivität in den einzelnen Extrakten nach Zugabe von p-Hydroxybenzoesäure

Aktivität im	Ipm/Pflanze		Gehalt berechnet in /ug der zugesetzten Verbindung. (in %)		Bezogen auf Aktivität in Sproß bzw. Wurzel=100 %	
	3 Tage	6 Tage	3 Tage	6 Tage	3 Tage	6 Tage
<u>Aetherextrakt</u>						
Sproß	3501	7910	7(0,32)	16(0,52)	18	17
Wurzel	939	1297	2(0,06)	3(0,08)	1	1
<u>Methanolextrakt</u>						
Sproß	13990	35217	28(0,91)	71(2,30)	72	76
Wurzel	55193	86383	112(3,60)	175(5,64)	82	86
<u>Wasserextrakt</u>						
Sproß	371	958	0,8(0,02)	2(0,06)	2	2
Wurzel	8085	8363	16(0,53)	17(0,55)	12	8
<u>Extraktions- rückstand</u>						
Sproß	1601	2080	3(0,10)	4(0,13)	4	5
Wurzel	3348	5126	7(0,22)	10(0,33)	5	5

Tabelle 7

Verteilung der Aktivität in den einzelnen Extrakten nach
Zugabe von Vanillinsäure

Aktivität im	I _{pm} /Pflanze		Gehalt berechnet in /ug der zugesetzten Verbindung (in %)		Bezogen auf Aktivität in Sproß bzw. Wurzel=100 %	
	3 Tage	6 Tage	3 Tage	6 Tage	3 Tage	6 Tage
<u>Aetherextrakt</u>						
Sproß	787	5815	-(0,03)	6(0,21)	4	14
Wurzel	1203	8274	-(0,04)	8(0,30)	1	4
<u>Methanolextrakt</u>						
Sproß	14326	25379	15(0,51)	27(0,91)	68	62
Wurzel	82678	174074	89(2,95)	187(6,21)	73	75
<u>Wasserextrakt</u>						
Sproß	1934	3168	2(0,07)	3(0,11)	9	8
Wurzel	19139	24322	20(0,68)	26(0,87)	17	10
<u>Extraktions- rückstand</u>						
Sproß	3968	6521	4(0,14)	7(0,23)	19	16
Wurzel	10015	25329	11(0,36)	27(0,90)	9	11

Tabelle 8

Verteilung der Aktivität in den einzelnen Extrakten nach Zugabe von Syringasäure

Aktivität im	Ipm/Pflanze		Gehalt berechnet in /ug der zugesetzten Verbindung (in %)		Bezogen auf Aktivität in Sproß bzw. Wurzel=100 %	
	3 Tage	6 Tage	3 Tage	6 Tage	3 Tage	6 Tage
<u>Aetherextrakt</u>						
Sproß	592	571	1(0,04)	1(0,04)	4	3
Wurzel	1312	610	3(0,10)	1(0,04)	2	1
<u>Methanolextrakt</u>						
Sproß	10704	13718	24(0,78)	30(1,00)	66	60
Wurzel	51952	83250	115(3,79)	184(6,07)	93	93
<u>Wasserextrakt</u>						
Sproß	1361	2557	3(0,10)	6(0,19)	8	11
Wurzel	1262	4664	3(0,09)	10(0,34)	2	5
<u>Extraktions- rückstand</u>						
Sproß	3511	5893	8(0,26)	13(0,43)	22	26
Wurzel	1335	1140	3(0,10)	3(0,08)	3	1

Wie aus den Tabellen 6, 7, 8 ersichtlich ist, befand sich die Hauptmenge der extrahierbaren Aktivität jeweils im Methanolextrakt. Die verhältnismäßig geringfügige Aktivität in den Aetherextrakten könnte besagen, daß die aufgenommenen Säuren nur in sehr unbedeutender Menge als freie Säure in der Pflanze vorhanden sind. Wie in mehreren Untersuchungen (PRIDHAM und SALTMARSH 1963, PRIDHAM 1964, HUTCHINSON, ROY und TOWERS 1958) eindeutig gezeigt werden konnte, werden zugesetzte Phenole, wenn sie in die Blätter und Sämlinge höherer Pflanzen aufgenommen werden, sehr rasch in Glucoside oder in die entsprechenden Glucoseester (HARBORNE and CORNER 1961) übergeführt. Zur Klärung der Frage, in welchen chemischen Verbindungen die Aktivität vor-

liegt, wurden die Extrakte chromatographisch analysiert.

Im Extraktionsrückstand, der sich aus Cellulose, Lignin sowie nicht löslichen Proteinen zusammensetzt, war besonders in den Sproßrückständen der mit Vanillinsäure und Syringasäure behandelten Pflanzen noch eine beachtenswerte Aktivität aufzufinden. Um festzustellen, wieviel der Aktivität des Rückstandes in Form der Cellulose vorliegt, wurde der Extraktionsrückstand der Sproße von Pflanzen, denen Vanillinsäure appliziert worden war, auf Holocellulose und α -Cellulose aufgearbeitet. Die Vorschrift zur Isolierung von Holocellulose und α -Cellulose wurde von ADAMS und CASTAGNE (1948) in Anlehnung an die Vorschrift von WISE, MURPHY und D'ADDIECO (1946) ausgearbeitet. Nach dieser Methode besteht der Extraktionsrückstand zu 77,4 % aus Holocellulose, während 39,9 % des Rückstandes α -Cellulose sind.

Von den erhaltenen Fraktionen des Extraktionsrückstandes wurden aliquote Anteile in der Schöniger Apparatur verbrannt und die Aktivität bestimmt. Auf Grund der Meßergebnisse befand sich 60 % der im Extraktionsrückstand gefundenen Aktivität in der Holocellulose, während 34 % der Aktivität des Rückstands in der α -Cellulose wiedergefunden wurden. Bezieht man diese Werte auf die in den Sproß aufgenommene Aktivität, so waren 8,5 % der Aktivität im Sproß in der Holocellulose bzw. 4,8 % in der α -Cellulose lokalisiert.

3.222 Charakterisierung der verschiedenen Extrakte mittels der Dünnschichtchromatographie und UV-Spektroskopie

Aliquote Anteile der Extrakte wurden mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie chromatographisch getrennt (STAHL und HALPAPP). Die Extrakte wurden dabei neben den punktförmig aufgetragenen Testsubstanzen bandförmig auf Kieselgel-GF 254 (Merck)-Platten (20 x 20 cm) von 1 mm Schichtdicke aufgetragen. Die Platten wurden in dem Laufmittelsystem Aether:

n-Hexan 60:40 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig/100 ml Laufmittel mehrfach in der gleichen Richtung entwickelt. Dieses Laufmittel bot den großen Vorteil, daß es relativ leicht nach der Chromatographie von den Platten zu entfernen war und bei den spektroskopischen Bestimmungen nicht stört. Nach der Entwicklung wurden die Platten für die Dokumentation im UV-Licht (Uvis-Desaga) photographiert und anschließend die einzelnen Banden der im UV-Licht blaufluoreszierenden Phenole und Phenolcarbonsäuren markiert. Die Banden wurden von der Platte in kleine Zentrifugengläser geschabt, mit 4 ml Methanol p.A. eluiert und das Kieselgel abzentrifugiert. Von den erhaltenen Eluaten wurde in einem registrierendem Spektrophotometer der Firma Beckman DK 2 ein UV-Spektrum aufgenommen. Weiterhin wurde ein aliquoter Anteil der Eluate in der Schöniger Apparatur verbrannt und die Aktivität bestimmt. In Abb. 16 treten zwei inaktive, unbekannte Banden auf.

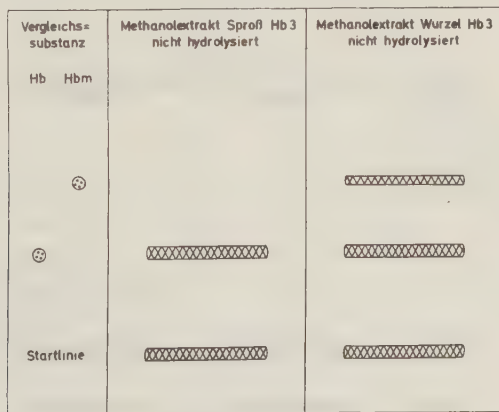


Abb. 15: Dünnschichtchromatogramme der Methanolextrakte von Sproß und Wurzel der mit p-Hydroxybenzoesäure behandelten Pflanzen (3 Tage inkubiert)
 Abk. Hb = p-Hydroxybenzoesäure, Hbm = p-Hydroxybenzoesäuremethylester aktive Banden = schräg schraffiert

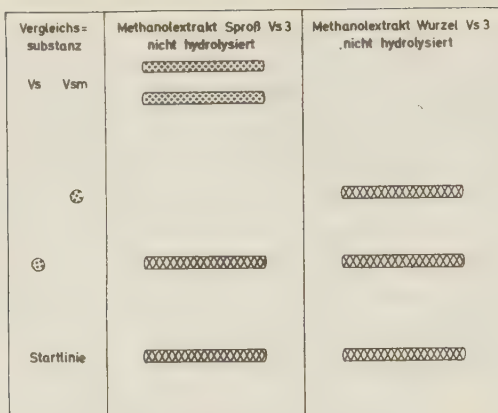


Abb. 16: Dünnschichtchromatogramme der Methanolextrakte von Sproß und Wurzel der mit Vanillinsäure behandelten Pflanzen (3 Tage inkubiert)

Abk. Vs = Vanillinsäure, Vsm = Vanillinsäuremethylester
aktive Banden = schräg schraffiert

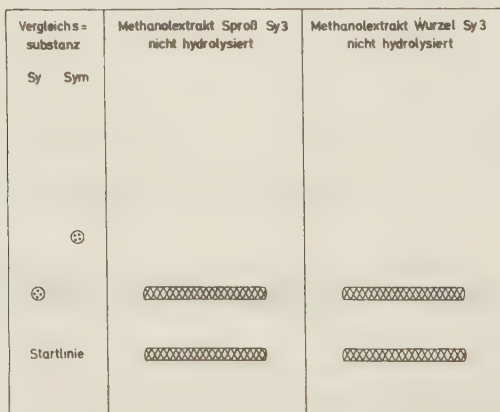


Abb. 17: Dünnschichtchromatogramme der Methanolextrakte von Sproß und Wurzel der mit Syringasäure behandelten Pflanzen (3 Tage inkubiert)

Abk. Sy = Syringasäure, sym = Syringasäuremethylester
aktive Banden = schräg schraffiert

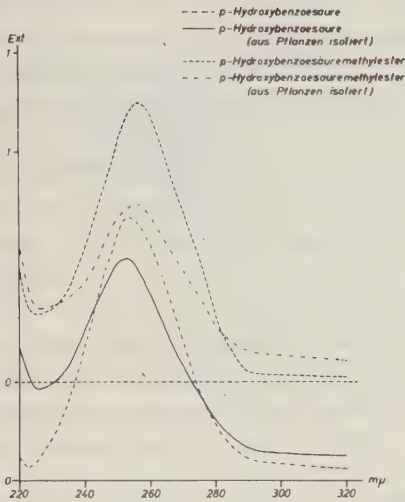
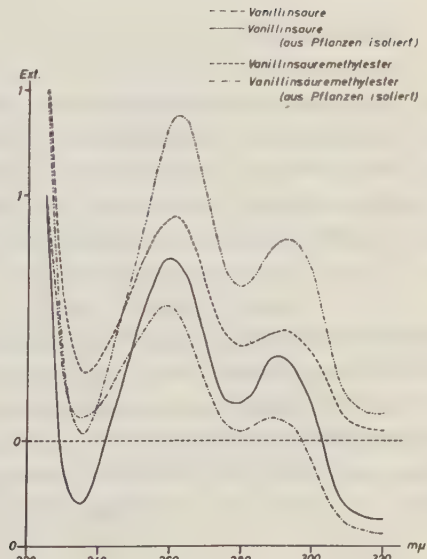


Abb. 18: UV-Spektren von p-Hydroxybenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäuremethylester (aus Pflanzen isoliert)

Abb. 19: UV-Spektren von Vanillinsäure und Vanillinsäuremethylester (aus Pflanzen isoliert)



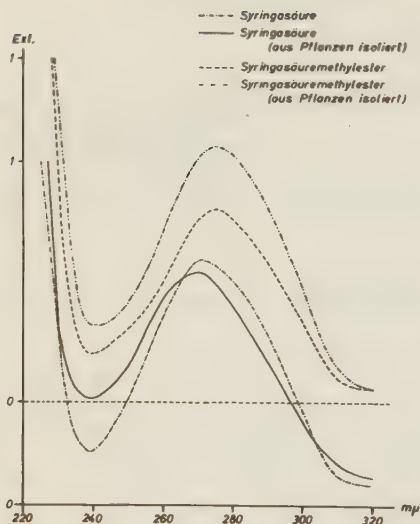


Abb. 20: UV-Spektren von Syringasäure und Syringasäuremethylester (aus Pflanzen isoliert)

Von den applizierten markierten Phenolcarbonsäuren trat p-Hydroxybenzoesäure als einzige in nennenswerter Menge im Aetherextrakt auf. Auf dem Chromatogramm dieses Extraktes war die p-Hydroxybenzoesäure als einzige Verbindung nachzuweisen. Die gesamte im Aetherextrakt nachgewiesene Aktivität trat dabei in der p-Hydroxybenzoesäure-Bande auf.

Auf dem Chromatogramm der Methanolextrakte traten neben den Banden der zugegebenen Phenolcarbonsäuren in den Wurzelextrakten der Pflanzen, denen p-Hydroxybenzoesäure bzw. Vanillinsäure appliziert worden war, die Methylester dieser zwei Verbindungen auf. Von der Aktivität in den Methanolextrakten von Pflanzen, die mit p-Hydroxybenzoesäure behandelt worden waren,

waren im Methanolextrakt des Sproßes 50,9 % und im Methanolextrakt der Wurzel 56,8 % in der p-Hydroxybenzoesäure-Bande lokalisiert. Für Vanillinsäure ergaben sich im Sproß 27,4 % und in der Wurzel 26,8 %, für Syringasäure im Sproß 18,4 % und in der Wurzel 36,5 %. Bezogen auf die Gesamtaktivität im Sproß bzw. in der Wurzel waren in der p-Hydroxybenzoesäure-Bande im Sproß 28,7 % und in der Wurzel 41,8 %, in der Vanillinsäure-Bande im Sproß 14,1 % und in der Wurzel 14,0 % sowie in der Syringasäure-Bande im Sproß 12,2 % und in der Wurzel 35,8 % der Aktivität in den applizierten Säuren lokalisiert.

Auf Grund dieser Tatsache müssen die applizierten Phenolcarbonsäuren, da sie mit Äther nicht extrahiert werden konnten, sowohl im Sproß als auch in der Wurzel teilweise in sorptiver Bindung oder in einer anderen gebundenen Form vorliegen.

3.223 Aktivitätsverteilung auf den DC-Platten und Hydrolyse der Extrakte mittels verschieden konzentrierter Schwefelsäure

Wie aus den Abbildungen der Chromatogramme ersichtlich ist, traten auf den Dünnschichtplatten der Sproß- und Wurzelextrakte mehrere Banden auf. Diese Banden können sowohl von natürlich in den Weizenpflanzen vorkommenden Phenolderivaten herrühren als auch von den applizierten markierten Verbindungen herkommen. Einen Aufschluß darüber gab die Aktivitätsverteilung auf den DC-Platten. Zu diesem Zweck wurden aliquote Anteile der Extrakte bandförmig auf schmale 4,5 x 30 cm Kieselgelplatten von 1 mm Schichtdicke aufgetragen und in dem Laufmittelsystem Äther: n-Hexan mehrfach in gleicher Richtung entwickelt. Die schmalen Dünnschichtplatten erlaubten eine Messung in der für Papierchromatogramme entwickelten Apparatur der Firma Tracerlab mit einem abgeschirmten Gasdurchflußzählrohr TGC 14.

Wie aus den Abbildungen der Chromatogramme weiterhin ersichtlich ist, zeigten die Startflecke eine sehr intensive Fluoreszenz, was auf die Anwesenheit von Glycosiden und Glucoseestern schliessen läßt. Diese Verbindungen wandern nicht in dem unpolaren Laufmittel Aether: n-Hexan. Da die Glycoside und Glucoseester durch saure oder alkalische Hydrolyse gespalten werden können, wurden aliquote Anteile der Extrakte einer Hydrolyse mit 2 n H_2SO_4 und 6 n HCl unterworfen, um die phenolischen Aglykone zu erfassen. Zu 1 ml des jeweiligen Extrakts wurden 5 ml der Säure hinzugefügt und für 12 Stunden unter Rückflußkühlung auf dem Sandbad hydrolysiert. Das Methanol wurde durch Erwärmen und mittels eines Stickstoffstromes aus dem Hydrolysat vertrieben. Das zurückbleibende wässrige Hydrolysat wurde mehrfach mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug unter Stickstoff bis zur Trockne eingeengt, mit 1 ml Methanol wieder aufgenommen und chromatographisch auf den schmalen DC-Platten analysiert.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Chromatogramme der mit 2 n bzw. 6 n H_2SO_4 hydrolysierten Alkoholextrakte sowie die Radiogramme dieser Chromatogramme.

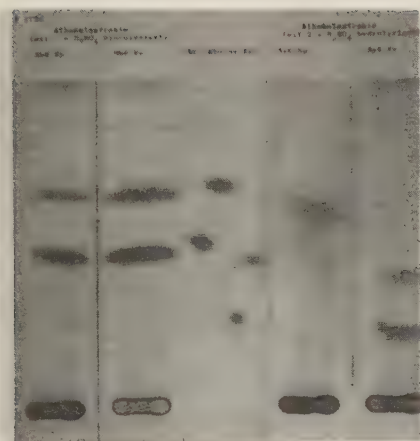


Abb. 21: Chromatogramme der mit 2 n H_2SO_4 hydrolysierten Methanolextrakte aus Sproß und Wurzel der mit p-Hydroxybenzoesäure und Syringasäure behandelten Pflanzen (6 Tage inkubiert)

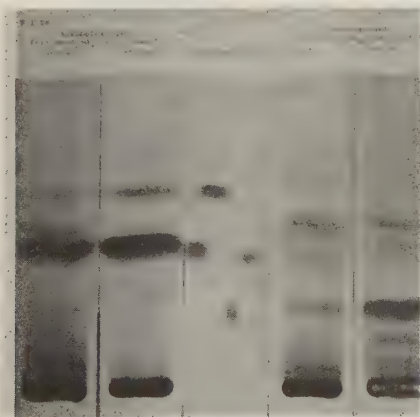


Abb. 22: Chromatogramme der mit 6 n H_2SO_4 hydrolysierten Methanolextrakte aus Sproß und Wurzel der mit p-Hydroxybenzoesäure und Syringasäure behandelten Pflanzen (3 Tage inkubiert)

Abk. Hb = p-Hydroxybenzoesäure, Hbm = p-Hydroxybenzoesäuremethylester, Sy = Syringasäure, Sym = Syringasäuremethylester

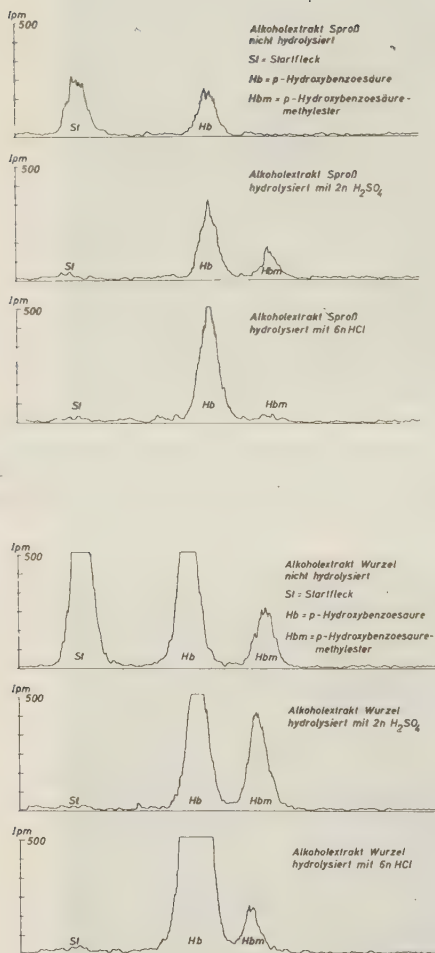


Abb. 23: Radiogramme der Dünnschichtchromatogramme der Methanolextrakte von Sproß und Wurzel der mit p-Hydroxybenzoesäure behandelten Pflanzen

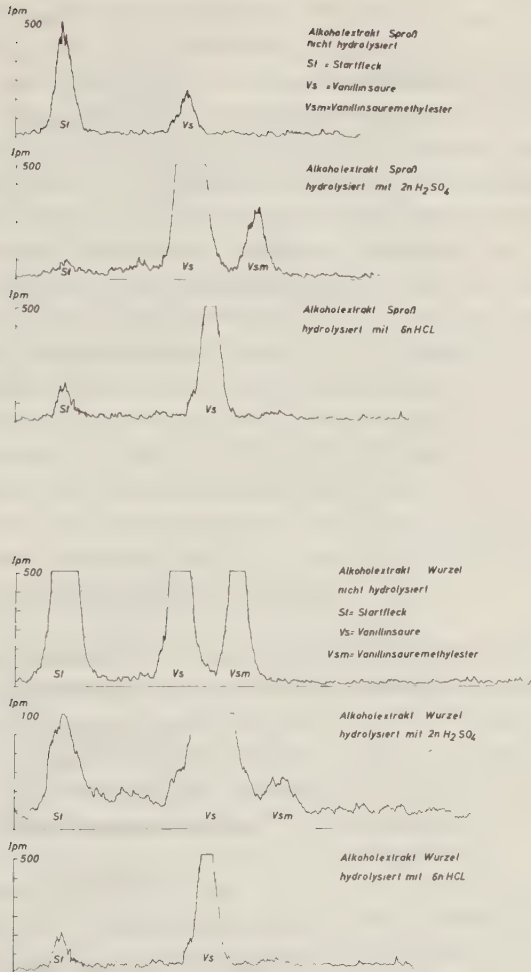


Abb. 24: Radiogramme der Dünnschichtchromatogramme der Methanolextrakte von Sproß und Wurzel der mit Vanillin-säure behandelten Pflanzen

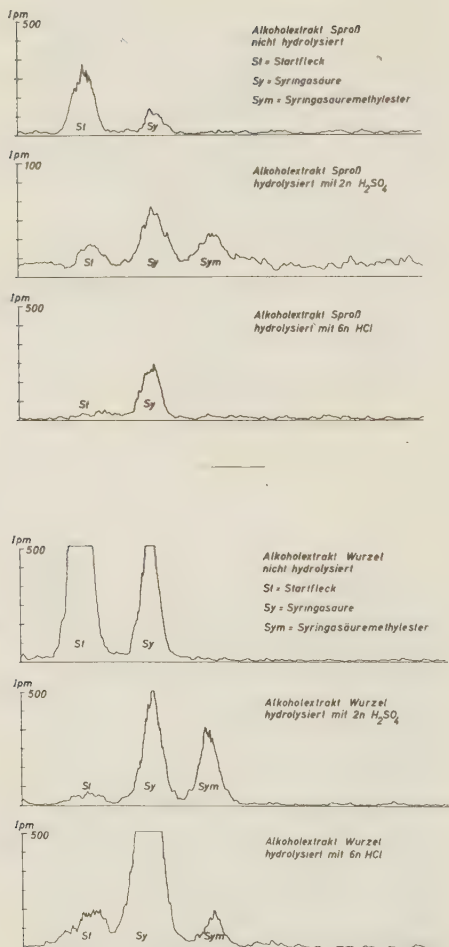


Abb. 25: Radiogramme der Dünnschichtchromatogramme der Methanolextrakte von Sproß und Wurzel der mit Syringinsäure behandelten Pflanzen

In den nicht hydrolysierten Sproßextrakten trat nur eine mit dem Lösungsmittel wandernde phenolische Verbindung auf, die Aktivität aufwies. Mittels Co-Chromatographie und Vergleich der UV-Spektren konnten diese Verbindungen eindeutig als die jeweils den Pflanzen applizierte Phenolcarbonsäure identifiziert werden. Bei der Hydrolyse des Methanolextraktes mit 2 n H_2SO_4 war neben der p-Hydroxybenzoesäure - bzw. Vanillinsäure- und Syringasäurebande in den Sproßextrakten jeweils eine zweite markierte Verbindung sichtbar, die nach der Hydrolyse mit 6 n HCl nur noch in Andeutung existent war. Nähere Untersuchungen dieser Substanzen mittels chromatographischer und spektrographischer Methoden sowie die Verwendung von Testsubstanzen ergaben, daß es sich um die Methylester der jeweils den Pflanzen applizierten Phenolcarbonsäuren handelte. Bei der Hydrolyse mit 6 n HCl wurde der p-Hydroxybenzoesäure- bzw. Vanillinsäure- und Syringasäuremethylester bereits verseift und in die entsprechenden Säuren überführt, so daß auf den Chromatogrammen hauptsächlich die betreffenden Säuren als markierte Verbindungen festzustellen waren.

In den nicht hydrolysierten Wurzelextrakten von Pflanzen, denen p-Hydroxybenzoesäure bzw. Vanillinsäure appliziert worden waren, waren sowohl die betreffenden Säuren als auch die Methylester festzustellen, während der Syringasäuremethylester erst nach Behandlung des entsprechenden Extraktes mit 2 n H_2SO_4 auf dem Chromatogramm sichtbar wurde.

Das Vorkommen von Methylester der Phenolcarbonsäuren im Pflanzenreich ist zwar in der Literatur beschrieben (KARRER 1958, NORD und VITUCCI 1947), jedoch erschien eine Bildung dieser Verbindungen in diesem Ausmaß doch als unwahrscheinlich. Während PRIDHAM and SALTMARSH (1963), PRIDHAM (1964), HUTCHINSON, ROY and TOWERS (1958) eine Überführung der von den Pflanzen aufgenommenen Phenole in ihre mono- β -D-Glycoside beschrieben, wiesen HARBORNE und CORNER (1961) die Bildung der entsprechenden Glucoseester der Phenolcarbonsäuren nach. Wie unter 1.1

ausgeführt wurde, sind die Glucoside und Glucoseester im Pflanzenreich allgemein verbreitet. Besonders in neuerer Zeit konnten die Glucoseester der verschiedensten Phenolcarbonsäuren aufgefunden werden.

Es bestand die Vermutung, daß die isolierten Methylester in den Alkoholextrakten während der Extraktion mit Methanol durch eine Umesterung aus den entsprechenden verhältnismäßig energiereichen Glucoseestern gebildet worden waren. Auch wurde von ZENK (1962) eine Umesterung von Glucosebenzoat zu Benzoessäureäthylester mit alkalischem Äthanol beschrieben. Daher wurde das Ausgangsmaterial - die homogenisierte, gefriergetrocknete Pflanzenmasse - mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Als Extraktionsmittel wurden neben Methanol und Äthanol auch Aceton und Dimethylformamid verwendet. Die erhaltenen Extrakte wurden nach den unter 2.14 bzw. 2.15 beschriebenen Methoden mittels Dünnschichtchromatographie und UV-Spektroskopie und durch Vergleich mit Testsubstanzen analysiert und charakterisiert.

Als Ergebnis zeigte sich, daß nur bei der Extraktion mit Methanol und Äthanol die Methyl- bzw. Äthylester nachweisbar waren, während sowohl im Aceton als auch im Dimethylformamidextrakt keine Methylesterbanden auf den Chromatogrammen auftraten. Dies zeigten auch die Radiogramme der Chromatogramme der einzelnen Extrakte. Bei Extraktion mit Methanol und Äthanol wiesen die entsprechenden Esterbanden Aktivität auf, während bei der Extraktion mit Aceton und Dimethylformamid außer im Startfleck und in der jeweiligen Phenolcarbonsäurebande keine weiteren aktiven Banden auf den Chromatogrammen auftraten. Dies war auch der Fall, wenn die Extrakte vor der Chromatographie mit 2 n H_2SO_4 hydrolysiert worden waren.

Um den Nachweis führen zu können, daß die applizierten Phenolcarbonsäuren in der Pflanze zum Teil als Glucoseester vorlagen, wurde wie in 2.4 beschrieben, der Glucoseester der p-Hydroxy-

benzoesäure nach der Methode von FISCHER und BERGMANN (1919) synthetisiert.

Da die Glucoside und Glucoseester mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nicht gut zu trennen waren, wurden die einzelnen nicht hydrolysierten Extrakte papierchromatographisch analysiert. Aliquote der verschiedenen Extrakte von Pflanzen, denen p-Hydroxybenzoesäure appliziert worden war, wurden in 3 cm Breite bandförmig neben der Testsubstanz p-Hydroxybenzoylglucose aufgetragen. Das Chromatogramm wurde absteigend im Laufmittel n-Butanol: Eisessig: Wasser (4:1:2,2) entwickelt. Durch Bedampfen mit Ammoniak waren die Glucoseester als hellfluoreszierende Banden unter der Analysen-Quarzlampe zu erkennen. Der Rf-Wert der p-Hydroxybenzoylglucose wurde zu 0,68 ermittelt. In allen Extrakten (Methanol-, Aceton-, Dimethylformamidextrakt) trat eine Bande auf, die mit der p-Hydroxybenzoylglucose in gleicher Höhe lief und das gleiche fluoreszenzanalytische Verhalten zeigte. Die Radiogramme dieser Chromatogramme zeigten weiterhin, daß diese Bande Aktivität aufwies. Es ist somit der Beweis erbracht, daß die applizierten Phenolcarbonsäuren in der Pflanze teilweise als Glucoseester vorliegen.

Zum Nachweis, daß diese Glucoseester während der Extraktion mit Methanol eine Umesterung erfahren, wurde die synthetisch dargestellte p-Hydroxybenzoylglucose in Methanol gelöst und unter den Extraktionsbedingungen 12 Stunden unter Rückflußkühlung auf dem Sandbad erhitzt. Auf dem Chromatogramm war neben der p-Hydroxybenzoylglucose der p-Hydroxybenzoesäuremethylester nachweisbar.

Aus den genannten Befunden ergab sich, daß das Auftreten der Methylester der den Pflanzen applizierten Phenolcarbonsäuren eine Folge der Extraktion mit Methanol war. Die als Methylester isolierten Phenolcarbonsäuren lagen ursprünglich in der Pflanze als Glucoseester vor, die unter den aufgeführten

Extraktionsbedingungen eine Umesterung erfuhren. Die Umesterung verlief nicht quantitativ, denn im Methanolextrakt konnte der Glucoseester noch nachgewiesen werden.

Wie aus den Abbildungen der Chromatogramme und deren Radiogramme zu erkennen ist, waren die Methylester nur nach Hydrolyse der Methanolextrakte mit 2 n H_2SO_4 in den Sproßen nachweisbar. Auch wenn man die Startflecke auf den Chromatogrammen von nicht hydrolysierten Extrakten mit 2 n H_2SO_4 hydrolysierte, traten neben der freien Säure die entsprechenden Methylester auf; nach Hydrolyse mit 6 n HCl nur noch die freien Säuren. Hieraus war zu schließen, daß neben den freien Säuren auch die Glucoseester als Glucoside vorliegen mußten. Zur Klärung dieser Frage wurde eine enzymatische Hydrolyse mittels einer β -Glucosidase durchgeführt.

3.224 Hydrolyse der Extrakte mittels einer β -Glycosidase

Ein Aliquot der nicht hydrolysierten Methanolextrakte wurde zunächst auf präparativen Dünnschichtplatten mit dem Laufmittel Aether: n-Hexan getrennt. Da die Glucoside und Glucoseester in diesem Laufmittel nicht wandern, sondern auf dem Startfleck zurückbleiben, wurde der Startfleck von der DC-Platte in kleine Zentrifugengläser geschabt, mit Methanol eluiert, das Kieselgel abzentrifugiert und die methanolische Lösung unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 5 ml 0,02 m Natriumacetat-Puffer, pH 5,5 aufgenommen. Im Natriumacetat-Puffer war in 1 %iger Konzentration die β -Glucosidase (reinst. 400 E/mg; Serva Entwicklungslabor Heidelberg) gelöst. Die Behandlungsdauer betrug 6 Stunden bei 27°C. Es wurde weitestgehend unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um jegliche Störung durch Mikroorganismen zu unterbinden. Das Hydrolysat wurde mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug bis auf 1 ml eingengt und chromatographisch analysiert. Von den Chromatogrammen wurden Radiogramme angefertigt, um die Aktivitätsverteilung auf den Platten zu bestimmen.

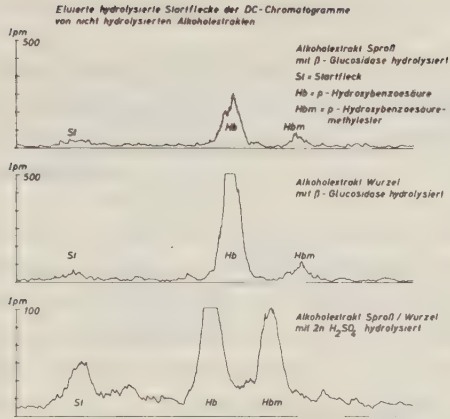


Abb. 26: Radiogramme der mit β -Glucosidase hydrolysierten Startflecke von nicht hydrolysierten Methanolextrakten von Sproß und Wurzel p-Hydroxybenzoesäure behandelter Pflanzen

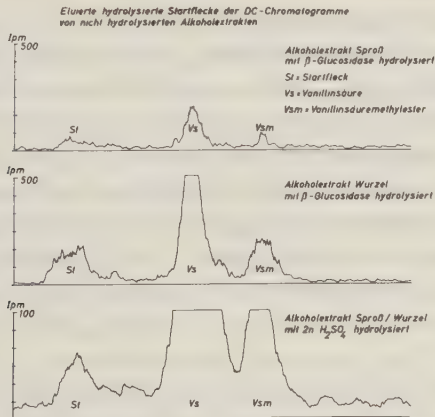


Abb. 27: Radiogramme der mit β -Glucosidase hydrolysierten Startflecke von nicht hydrolysierten Methanolextrakten von Sproß und Wurzel Vanillinsäure behandelter Pflanzen

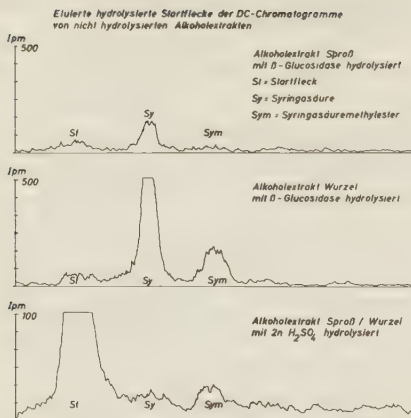


Abb. 28: Radiogramme der mit β -Glucoside hydrolysierten Startflecke von nicht hydrolysierten Methanolextrakten von Sproß und Wurzel Syringasäure behandelter Pflanzen

Wie aus den Radiogrammen ersichtlich ist, wurden durch die enzymatische Hydrolyse mittels einer β -Glucosidase sowohl die applizierten Phenolcarbonsäuren als auch ihre Methylester freigesetzt. Das bedeutet, daß die Säuren und die Methylester - die letzteren lagen ursprünglich in der Pflanze als Glucoseester vor - glycosidisch gebunden waren. Die applizierten Phenolcarbonsäuren wurden nach der Aufnahme in der Pflanze sowohl in Glucoside als auch in Glucoseester überführt, wobei die Glucoseester wiederum glucosidisch gebunden oder die Glucoside mit Glucose verestert sein können.

Da die Methylester im Sproß und bei Fütterung von Syringasäure auch in der Wurzel erst nach einer Hydrolyse mit 2 n H_2SO_4 nachweisbar waren, ergab sich die Schlußfolgerung, daß die Glucoseester im Sproß und bei Syringasäurebehandlung auch in der Wurzel glucosidisch gebunden waren. Dieser Befund war nur durch die Umesterung der Glucoseester zu Methylester möglich, da die β -Glucosidase sowohl die Glu-

coside als auch die Glucoseester enzymatisch spaltete.

3.3 Untersuchungen über die Kohlendioxidabspaltung aus verschiedenen Carboxyl-¹⁴C- und Methoxyl-¹⁴C-markierten Phenolcarbonsäuren durch Sproß- und Wurzelstücke in der Warburg - Apparatur

In den bisher beschriebenen Untersuchungen mit Carboxyl-¹⁴C-markierten Phenolcarbonsäuren konnte beobachtet werden, daß aus den einzelnen markierten Verbindungen unterschiedliche Mengen an markiertem Kohlendioxid auftraten. Der von den Pflanzen als CO₂ ausgeschiedene Anteil betrug bei p-Hydroxybenzoesäure ca. 7 %, bei Vanillinsäure 35 % und bei Syringasäure 45 % der insgesamt von der einzelnen Pflanze aufgenommenen Aktivität. Da der Grad der Kohlendioxidabspaltung von der Anzahl, der Stellung und der Art der Substituenten am aromatischen Ring abhängig war, wurde die Abspaltung von Kohlendioxid bei der Einwirkung von Sproß- und Wurzelstücke auf verschiedene Carboxyl-¹⁴C-markierte Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren untersucht. Um weiterhin zu untersuchen, ob auch andere Gruppen des Kohlenstoffgerüsts in gleichem Maße abgebaut werden, wurden auch einige Methoxyl-markierte Verbindungen bzw. C₂ und C₃ markierte Kaffeesäure eingesetzt. Daneben fanden auch Benzoesäure, sowohl Carboxyl- als auch Ring-markiert Anwendung, um die Einführung von Hydroxylgruppen und eine evtl. Ringspaltung zu untersuchen. Das Pflanzenmaterial wurde unter den beschriebenen sterilen Kulturbedingungen angezogen. Zehn Tage alte Weizenpflanzen wurden in Sproß und Wurzelanteil getrennt und mit einer Schere in 2-3 mm große Stücke zerschnitten. Diese Sproß- und Wurzelstückchen wurden in Warburg-Gefäße gegeben und zusammen mit den in Phosphatpuffer gelösten Verbindungen in einer Warburg Apparatur (Modell V 85 der Firma Braun in Melsungen) geschüttelt. Um auf eine angenäherte Volumenkonstanz in den Warburggefäßen zu kommen, wurden jeweils 200 mg der frischen Sproßstücke und 100 mg der Wurzelstücke

unter weitestgehenden sterilen Bedingungen in den Hauptraum der Warburg-Gefäße eingewogen und in 2,3 bzw. 2,4 ml Phosphatpufferlösung pH 5,5 nach SÖRENSEN suspendiert. Der Mitteleinsatz der Gefäße wurde mit 0,2 ml Natronlauge (10 % NaOH) beschickt, um das während der Reaktion freigesetzte Kohlendioxid zu binden. In die Ansatzbirne der Gefäße wurde 0,5 ml der in Phosphatpuffer gelösten jeweiligen Säure eingegeben und nach Temperatureinstellung (30°C) und Schließen des Manometers in den Hauptraum gegeben und dadurch die Reaktion gestartet. Das Gesamtvolumen in den Gefäßen betrug 3,2 ml und die Menge der in der Lösung enthaltenen phenolischen Verbindungen 0,5 mg/Gefäß. Der Versuch lief 2 1/2 Stunden, danach wurde die Natronlauge herausgenommen und das in ihr gebundene radioaktive Kohlendioxid für die Messung, wie unter 2.33 beschrieben, verwendet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Ein signifikanter Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme der Sproß- oder Wurzelstückchen durch die applizierten Verbindungen konnte dabei nicht festgestellt werden. Sie war gegenüber den Kontrollen, besonders in der Wurzel etwas erniedrigt. Die O_2 -Aufnahme bei den Sproß-Stückchen betrug im Durchschnitt etwa $27,6/\mu$ mol O_2/g Frischgewicht und bei den Wurzel-Stückchen $28,7/\mu$ mol O_2/g Frischgewicht.

Tabelle 9

Bestimmung der Abspaltung der Carboxylgruppe und Methoxylgruppe als CO_2 bei verschiedenen Carboxyl- ^{14}C -markierten und Methoxyl- ^{14}C -markierten Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren durch Sproß- und Wurzelstücke von Weizenkeimpflanzen

Phenole	Stellung der Substituenten am Ring			Pflanzenorgan	Abspaltung als CO_2 der zugesetzten Menge	
	3 St.	4 St.	5 St.		in %	in μg
Benzoessäure				Sproß	-	0,015
$^{14}\text{-COOH}$ mark.	-	-	-	Wurzel	0,02	0,116
Benzoessäure				Sproß	0,03	0,154
$^{14}\text{C-Ring}$ mark.	-	-	-	Wurzel	0,04	0,215
p-Hydroxybenzoessäure				Sproß	0,05	0,245
$^{14}\text{COOH}$ mark.	-	OH	-	Wurzel	1,46	7,297
Protokatechusäure				Sproß	1,06	5,315
$^{14}\text{COOH}$ mark.	OH	OH	-	Wurzel	2,34	11,716
Vanillinsäure				Sproß	1,55	7,736
$^{14}\text{COOH}$ mark.	OCH_3	OH	-	Wurzel	5,83	29,141
Vanillinsäure				Sproß	0,04	0,179
$^{14}\text{CH}_3$ mark.	OCH_3	OH	-	Wurzel	0,04	0,205
Syringasäure				Sproß	4,22	21,079
$^{14}\text{COOH}$ mark.	OCH_3	OH	OCH_3	Wurzel	5,79	28,963
Syringasäure				Sproß	0,07	0,350
$^{14}\text{CH}_3$ mark.	OCH_3	OH	OCH_3	Wurzel	-	-
p-Cumarsäure				Sproß	1,16	5,780
$^{14}\text{COOH}$ mark.	-	OH	-	Wurzel	2,65	13,226
Kaffeessäure				Sproß	1,11	5,833
$^{14}\text{COOH}$ mark.	OH	OH	-	Wurzel	1,17	5,535
Kaffeessäure				Sproß	0,01	0,054
$^{14}\text{C}_2$ mark.	OH	OH	-	Wurzel	0,03	0,137
3,4 Dimethoxyzimtsäure				Sproß	0,16	0,795
$^{14}\text{COOH}$ mark.	OCH_3	OCH_3	-	Wurzel	0,10	0,504
Sinapinsäure				Sproß	5,57	27,844
$^{14}\text{COOH}$ mark.	OCH_3	OH	OCH_3	Wurzel	5,69	28,459

Allgemein war zu erkennen, daß bei den Carboxyl-¹⁴C-markierten Säuren eine nennenswerte Abspaltung der Carboxylgruppe nur dann erfolgte, wenn in p-Stellung zur Carboxylgruppe eine Hydroxylgruppe stand. Die Abspaltungsrate erhöhte sich, wenn in o-Stellung zur Hydroxylgruppe eine weitere Hydroxylgruppe eingeführt war. Eine weitere Steigerung der Abspaltungsrate wurde dadurch erzielt, wenn in o-Stellung zur p-ständigen Hydroxylgruppe eine oder zwei Methoxylgruppen standen. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigten die Carboxyl-¹⁴C-markierte Syringasäure und die Sinapinsäure, die das gleiche Substituentenmuster am aromatischen Ring besitzen, die höchste Abspaltungsrate von Kohlendioxid, während die Benzoesäure nur äußerst geringfügig decarboxyliert wurde.

Ist die p-standige Hydroxylgruppe, wie im Falle der 3,4-Dimethoxyzimtsäure, veräthert, so war ebenfalls nur eine geringfügige Abspaltung der Carboxylgruppe feststellbar.

Die Methoxyl-¹⁴C-markierte Vanillinsäure und Syringasäure wiesen auch nur eine geringe Abspaltung von Kohlendioxid auf, so daß eine rasche Demethoxylierung oder Demethylierung dieser Verbindungen in den Weizenkeimpflanzen nicht als wahrscheinlich anzunehmen ist.

Auffällig war weiterhin, daß die geprüften Verbindungen durch die Wurzelstücke teilweise wesentlich stärker decarboxyliert werden. Mit zunehmender Zahl der Substituenten gleichen sich Sproß und Wurzel in ihrem Vermögen, die Carboxylgruppe abzuspalten, an. Während das Verhältnis zwischen Sproß und Wurzel bei p-Hydroxybenzoesäure noch 1:30 beträgt, ist es im Falle der Syringasäure fast gleichwertig. Für die Untersuchungen über die Aufnahme dieser Verbindungen durch die Wurzel bedeutet dies, daß der überwiegende Anteil der aufgenommenen Substanz in der Wurzel decarboxyliert wurde. Wenn aber, wie im Falle der p-Hydroxybenzoesäure, freie Säure bis in den Sproß gelangte, so besaß auch der Sproß das Vermögen, die Carboxyl-

gruppe dieser Verbindungen abzuspalten.

Wie aus den in 3.21 und 3.22 durchgeführten Untersuchungen über die Aufnahme Carboxyl- ^{14}C -markierter Vanillinsäure bzw. p-Hydroxybenzoesäure und Syringasäure zu erkennen ist, war die Abspaltung von markiertem Kohlendioxid zwar abhängig von der jeweils applizierten Substanz, jedoch verlief sie in beachtenswertem Umfang. Im Falle der Syringasäure wurden nach den in 3.22 geschilderten Versuchen bis zu 45 % der von der Pflanze insgesamt aufgenommenen Menge decarboxyliert. Durch die unter 2.12 beschriebene Versuchsanordnung zur Anzucht der Weizenpflanzen wurde das von der Pflanze ausgeschiedene Kohlendioxid zwar rasch aus den Anzuchtglocken abgeführt, es stellte sich aber die Frage, in welchem Umfang das markierte CO_2 von Pflanzen endogen abgefangen wird und in welchem Ausmaß die Pflanzen das evtl. in der Nährlösung gelöste Kohlendioxid durch die Wurzel aufnehmen und in organische Verbindungen einbauen.

3.4 Die CO_2 -Aufnahme durch die Wurzel und der Einbau in Aminosäuren

In einer Reihe von Arbeiten wurde die Aufnahme von Kohlen- säure durch die Wurzeln und deren Einbau in der Pflanze mit Hilfe von ^{14}C untersucht. OVERSTREET et. al. (1940) sowie KURSANOV (1956), STOLWIJK und THIMANN (1957) und BEDRI et. al. (1960) kultivierten Pflanzen in Nährlösungen, die $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ oder $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ enthielten, während POEL (1953), JACOBSON (1955), so- wie JACKSON (1959) separierte Wurzeln oder Wurzelteile in kohlendioxidhaltigen Nährlösungen schüttelten. STOLWIJK und THIMANN (1957) sowie BEDRI et. al. (1960) und FÜHR (1962) be- lüfteten das Wurzelsystem mit $^{14}\text{CO}_2$ -haltiger Luft.

OVERSTREET und Mitarbeiter folgerten aus ihren Untersuchungen, daß nur HCO_3^- -Ionen von Pflanzenwurzeln absorbiert werden,

während alle anderen erwähnten Autoren in ihren Arbeiten nachwiesen, daß HCO_3^- -Ionen und CO_2 von Pflanzenwurzeln absorbiert und assimiliert werden und daß der Fixierungsweg für beide Stoffe als gleich angesehen werden kann. Physiologisch-chemisch scheint sich der Prozeß der CO_2 -Aufnahme durch die Wurzeln mit der für lebendes Gewebe ganz allgemein nachgewiesenen CO_2 -Dunkelfixierung zu decken und entspricht der CO_2 -Fixierung, wie sie heterotrophen Organismen eigen ist. SALTMAN und Mitarbeiter (1951), die vornehmlich die CO_2 -Dunkelfixierung bei Sukkulenteu untersuchten, wiesen nach, daß die CO_2 -Aufnahme nicht eine einfache Aufnahme und Speicherung von anorganischen Carbonat in pflanzlichem Gewebe ist, sondern ein spezieller, aktiver Einbau des aufgenommenen Kohlendioxids in organische Substanzen, nämlich primär eine Carboxylierung der Phosphoenolbrenztraubensäure (PEB) zu Oxalessigsäure durch die PEB-Carboxylase und sekundär weitere Umwandlungen in andere organische Säuren des Krebscyclus und hieraus entstehenden Syntheseprodukten wie Aminosäuren etc.

Daneben ist unter Umständen auch noch eine Carboxylierung von Brenztraubensäure unter dem Einfluß des Malatenzyms möglich, aber mengenmäßig scheint dieser Vorgang in der Pflanze keine große Rolle zu spielen.

Der weitaus überwiegende Teil des dunkelfixierten Kohlendioxids fand sich in den organischen Säuren. Innerhalb dieser Fraktion pflegte die Äpfelsäure die höchste spezifische Aktivität aufzuweisen (BEDRI et. al. 1960, GRAF und ARONOFF 1955, JACOBSEN 1955). Die Zucker oder phosphorylierte Zwischenprodukte enthielten je nach Versuchsbedingungen entweder gar keine oder zumeist erst nach Belichtung nur sehr geringe Mengen (BEDRI et. al. 1960) an Radiokohlenstoff.

Hingegen war in den Aminosäuren bald Radioaktivität nachweisbar (BEDRI et. al. 1960, POEL 1953), da grunsätzlich zu er-

warten ist, daß die durch die PEB-Fixierung von CO_2 gebildete Oxalessigsäure entweder zu Asparaginsäure aminiert wird oder in den Krebscyclus eingeht und durch Aminierung der α -Ketoglutarsäure die Glutaminsäure sowie die von dieser sich ableitenden Aminosäuren bildet. Daher müssen auch die aus den Zwischengliedern des Krebscyclus herrührenden Syntheseprodukte mit am meisten von dem markierten Kohlenstoff nutzen.

Um die Fixierung des aus der markierten Carboxylgruppe entstandenen Kohlendioxids unter den unter 2.12 beschriebenen Versuchsbedingungen zu untersuchen, wurden aus einem Aliquot der homogenisierten und gefriergetrockneten Pflanzensubstanz die Aminosäuren isoliert und die in ihnen fixierte Radioaktivität untersucht. Die Weizenpflanzen wurden unter den beschriebenen sterilen Kulturbedingungen angezogen und 10 Tage auf einer Nährlösung, die $200\text{ }\mu\text{g}$ Carboxyl- ^{14}C -markierte Vanillinsäure pro ml Nährlösung enthielt, kultiviert.

Nach der Gefriertrocknung wurden 50 mg des Sproßhomogenisats unter Zusatz von 10 ml 6 n HCl in einem Reagenzglas eingeschmolzen und 24 Std. bei 105°C im Trockenschrank hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde anschließend filtriert und das Filtrat im Exsikkator über CaCl_2 und Aetznatron zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml Wasser wieder aufgenommen und mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und der Chromatographie zweidimensional das Aminosäuregemisch nach den Methoden von WIELAND und PFLEIDERER (1955) getrennt.

1. Laufrichtung: Hochspannungselektrophorese bei 2,5 KV und 40 mA 1 Std. Puffer: Ameisensäure:Eisessig: Wasser (5:10:85) pH 1,9
2. Laufrichtung: Absteigende Chromatographie mit sec.-Butanol: Ameisensäure:Wasser (75:15:10)

Laufzeit 11-13 Stunden.

Das so getrennte Aminosäurengemisch wurde nach dem Trocknen mit Ninhydrin entwickelt und die Lage der einzelnen Aminosäuren nach HAIDER (1958) bestimmt. Bei einem weiteren Chromatogramm, bei dem die Aminosäuren nach derselben Methode und unter den gleichen Bedingungen getrennt worden war, wurde nur sehr schwach mit Ninhydrin besprüht, um die Lage der einzelnen Aminosäuren zu markieren. Die Flecken der Aminosäuren wurden dann ausgeschnitten, einzeln mit dem Papier in der Schöniger Apparatur verbrannt und im Flüssigkeitsszintillationszähler nach der in 2.33 beschriebenen Methode gemessen.

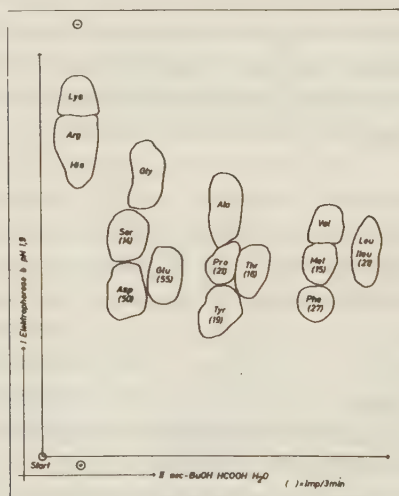


Abb. 29: Zweidimensional getrenntes Gemisch der Aminosäuren aus dem Hydrolysat des Sprosshomogenisats von Weizenpflanzen nach der Einwirkung von ¹⁴COOH markierter Vanillinsäure. Die Zahlen neben den einzelnen Aminosäuren geben die als Bariumcarbonat gemessenen Impulszahlen pro 3 Minuten an.

Die Abbildung (29) zeigt die Lage der einzelnen Aminosäuren. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, hatten vor allem die Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure, die sich direkt vom Citronensäurecyclus ableiten, die höchste Impulszahl, während Phenylalanin, Prolin, Tyrosin und Serin ebenfalls aktiv waren.

Um eine ungefähre, quantitative Bestimmung des in der Glutamin- und Asparaginsäure festgelegten Kohlendioxids durchführen zu können, wurde das Aminosäuregemisch aus dem Hydrolysat in einem Puffer mit dem pH-Wert 6,5 (Wasser:Pyridin:Eisessig 267:30:1) mittels der Hochspannungselektrophorese bei 2,5 KV und 40 m A über 45 Minuten getrennt. Dabei wandern nur die sauren Aminosäuren zum Pluspol und die basischen Aminosäuren zum Minuspol, während die neutralen Aminosäuren im Startfleck liegen bleiben. Das Gemisch wurde bandförmig neben den Testsubstanzen Glutaminsäure und Asparaginsäure aufgetragen. Die Testsubstanzen wurden nach dem Trocknen mit Ninhydrin entwickelt und so die Lage von Glutaminsäure und Asparaginsäure des Aminosäuregemisches auf dem Elektropherogramm lokalisiert. Die entsprechenden, nicht mit Ninhydrin entwickelten Banden des Aminosäuregemisches wurden ausgeschnitten, mit dem Papier zusammen in der Schöniger-Apparatur zu Kohlendioxid verbrannt, in Bariumcarbonat überführt und im Szintillationszähler die Aktivität gemessen.

Während die Gesamtpflanze 921200 Ipm/Pfl. und der Sproß allein 114121 Ipm an aufgenommener Aktivität enthielt, entfielen im Sproß auf die Asparaginsäure 2414 Ipm/Pfl. Sp. und 2521 Ipm/Pfl. Sp. auf die Glutaminsäure. Addiert man die Impulszahlen der Aminosäuren und setzt die Summe in Relation zur insgesamt im Sproß vorhandenen Aktivität, so waren ca. 4-5 % in den Aminosäuren im Sproß festgelegt. Setzt man die Summe der Impulszahlen der Aminosäuren zu dem von der Pflanze in dem in 3.22 nach Inkubation mit Vanillinsäure geschilderten Versuch ausgetrennten Kohlendioxid, ins Verhältnis, so ergibt sich, daß die Pflanze etwa 1,5 % in Aminosäuren im Sproß einbaute.

Das bei der Decarboxylierung der Phenolcarbonsäuren freiwerdende Kohlendioxid wurde also teilweise durch Refixierung des Kohlendioxids und weitere Umwandlung der Oxalessigsäure über den Citronensäurecyclus und Aminierung der Ketocarbonsäuren in geringem Ausmaß in Aminosäuren festgelegt. Daneben rührte wahrscheinlich auch die geringe, in der Cellulose festgelegte Aktivität von einer Fixierung des freigesetzten aktiven Kohlendioxids her.

4. Diskussion der Versuchsergebnisse

=====

Durch das Absterben der verschiedensten Organismen und durch deren weiteren mikrobiologischen Abbau gelangt eine Vielzahl organischer Verbindungen in den Boden. Bei der Einwirkung von holzerstörenden oder anderen ligninverwertenden Bodenmikroorganismen auf postmortales Pflanzenmaterial entstehen phenolische Spaltstücke des Lignins (HAIDER, LIM und FLAIG 1964; HAIDER 1965; LIM 1965). Hinsichtlich der Beobachtungen, daß von den organischen Substanzen des Bodens eine Wirkung auf das Wachstum der Pflanze ausgehen muß (FLAIG, SÜCHTIG 1962), die nicht mit einer reinen Nährstoffwirkung erklärt werden kann, war es notwendig, einen Einblick über die Aufnahme dieser Substanzen durch die intakte Pflanzenwurzel zu bekommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Phenolcarbonsäuren, die in der Carboxylgruppe mit Radiokohlenstoff markiert waren, die Aufnahme von phenolischen Ligninspaltstücken durch die Pflanzenwurzel und ihre Umwandlung in der Pflanze untersucht. Diese Untersuchungen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erwies es sich, daß phenolische Ligninspaltstücke, die im Laufe des Ligninabbaues anfallen, von Pflanzen über die Wurzel aufgenommen werden kön-

nen. Nach Zugabe von Carboxyl- ^{14}C -markierter p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Syringasäure konnte durch die getrennte Bestimmung der Aktivität im Sproß und in der Wurzel weiterhin nachgewiesen werden, daß ein Teil der aufgenommenen Substanzen in oberirdische Organe geleitet wurde. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, daß eine Verteilung der Aktivität über die gesamte Pflanze erfolgte. Dies wird auch durch die in Abb. 30 gezeigten Autoradiogramme der Pflanzen nach Aufnahme der obengenannten carboxylmarkierten Phenolcarbonsäuren bestätigt. Es ist zu erkennen, daß die markierten Verbindungen im Sproß besonders in den während der Inkubationszeit gebildeten Organen angereichert sind. In den Blattspreiten heben sich die Blattnerven - besonders der Mediannerv - als leitendes Gewebe auffällig vom übrigen Gewebe durch einen höheren Gehalt an Aktivität ab.



Abb. 30: Autoradiogramme von Pflanzen nach Aufnahme von p-Hydroxybenzoesäure (I), Vanillinsäure (II) und Syringasäure (III).

In ihren Untersuchungen über die Aufnahme verschiedener phenolischer Verbindungen stellten WINTER und SCHÖNBECK (1959), WINTER, PREUSS und SCHÖNBECK (1959), WINTER, SCHÖNBECK-PREUSS und SCHÖNBECK (1959) sowie WINTER, BRÜSEWITZ und SCHÖNBECK (1960) qualitativ eine Aufnahme fest. Durch Vergleich der Chromatogramme der Extrakte von behandelten und unbehandelten Pflanzen schlossen sie bei den vermehrt auftretenden Substanzen in den behandelten Pflanzen auf eine Aufnahme dieser Verbindungen. Ein solcher Vergleich kann zwar Rückschlüsse über eine qualitative Aufnahme zulassen, jedoch sagen die Ergebnisse nichts über die Menge der aufgenommenen Verbindung und deren Verteilung über die einzelnen Pflanzenorgane aus. Derartige quantitative Angaben wurden erst durch die Anwendung markierter phenolischer Verbindungen möglich. Mit Hilfe der markierten Verbindungen konnten ferner die Umwandlungsprodukte dieser Verbindungen in der Pflanze erfaßt und identifiziert werden.

Weiterhin arbeiteten die genannten Autoren unter nicht sterilen Bedingungen, so daß eine Umwandlung bzw. ein Abbau der applizierten Verbindungen im Boden und in der Nährlösung durch eventuell vorhandene Mikroorganismen-tätigkeit sicher stattfindet. Bei den Bodenmikroorganismen gibt es nach Untersuchungen von HENDERSON (1961) eine verhältnismäßig große Anzahl niederer Bodenpilze und Hefen, die einfache phenolische Verbindungen vollständig abzubauen vermögen.

Aus den im Abschnitt 3.22 beschriebenen Untersuchungen und den Tabellen 3,4,5 ist zu ersehen, daß mit einer Verlängerung der Inkubationszeit eine vermehrte Aufnahme in die Pflanze parallel läuft. Die von den Pflanzen der Nährlösung entnommene Menge an applizierter Substanz betrug je nach Inkubationszeit (3 bzw. 6 Tage) bei p-Hydroxybenzoesäurezugabe 7 bzw. 11,5 %, bei Vanillinsäurezugabe 10 bzw. 16,8 % und bei Syringasäurezugabe 9 bzw. 17,2 % der angebotenen Menge der jeweiligen Phenolcarbonsäure. Diese aufgenommene Menge war aber bei p-Hydroxy-

benzoesäurezugabe zu annähernd 68 % und bei Vanillin- und Syringasäurezugabe zu 55 bzw. 43 % in der Wurzel lokalisiert, während im Sproß bei p-Hydroxybenzoesäurezugabe 1,62 bzw. 2,9 %, bei Vanillinsäurezugabe 1 - 1,7 % und bei Syringasäurezugabe 1,1 bzw. 1,8 % der applizierten Säuremenge gefunden wurden. Obwohl die Wurzeln mit verdünnter Natronlauge und Wasser gewaschen wurden, läßt die hohe Menge an freien Säuren in der Wurzelmasse vermuten, daß ein Teil der markierten Phenolcarbonsäuren nur äußerlich von den Wurzeln adsorbiert wurde und nicht bis in das Wurzelinnere vordrang. FÜHR und SAUERBECK (1964, 1965) konnten an Hand von Autoradiogrammen von Wurzelschnitten von *Raphanus sativus* und *Daucus carota* nach Fütterung von Extrakten markierter organischer Rotteprodukte zeigen, daß eine starke Anreicherung der markierten Verbindungen an oder in der Rübenepidermis auftrat.

Die in der Wurzelmasse festgestellte Menge an Phenolcarbonsäuren ist daher wahrscheinlich nicht vollständig als eine echte Aufnahme durch die Pflanze zu werten. Es ist mit den bisher angewendeten Methoden jedoch noch nicht möglich gewesen, eine Trennung zwischen den nur oberflächlich adsorbierten und dem tatsächlich in die Wurzel eingedrungenen Anteil der gefundenen Menge durchzuführen.

Nicht nur die Aufnahme, sondern auch die Translokation der applizierten Verbindungen hängt stark von der Molekülgröße und der Molekülstruktur ab, wie McLAREN et. al. (1960) für Lysozym und Hämoglobin sowie FÜHR und SAUERBECK (1964, 1965) für Huminsäurefraktionen aus Rotteprodukte nachweisen konnten. Höhermolekulare Verbindungen bleiben überwiegend außen an den Wurzeln haften und dringen nur zu einem geringen Teil in diese ein. Der Transport dieser Verbindungen in den Sproß war kaum nennenswert und lag nach Huminsäuregabe (FÜHR und SAUERBECK 1965) bei 0,007 % des Gesamtkohlenstoffgehaltes der Sproßmasse.

Legt man zugrunde, daß die Trockenmasse der Sproße der Weizenpflanzen zu 45 % aus Kohlenstoff besteht, so errechnet sich der Radiokohlenstoffgehalt der mit p-Hydroxybenzoesäure behandelten Pflanzen zu 0,29 % des Gesamtkohlenstoffgehaltes des Sproßes. Bei Vanillinsäure und Syringasäure behandelten Pflanzen liegen 0,12 % des Gesamtkohlenstoffgehaltes der Sproße als Radiokohlenstoff vor.

Wie aus den Untersuchungen 3.14 und 3.21 über die Abhängigkeit der Aufnahme von der Wasserstoffionenkonzentration zu entnehmen ist, besteht zwischen der Aufnahme und der Translokation der applizierten Verbindungen und der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung eine Abhängigkeit. Die maximale Aufnahme in den Sproß erfolgte bei einem pH-Wert der Nährlösung, der dem pK-Wert der applizierten Verbindung entspricht. Dies steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von SIMON und BEEVERS (1952) sowie ZENK (1965b).

Um die aufgenommenen Phenolcarbonsäuren und deren Umwandlungsprodukte sowie die durch die CO_2 -Fixierung entstandenen markierten Verbindungen wie z.B. die Aminosäuren erfassen zu können, wurde die Pflanzentrockenmasse von Sproß und Wurzel nacheinander mit den unterschiedlich polaren Lösungsmitteln Aether, Methanol und Wasser extrahiert. Im Aetherextrakt sollten sich die in der Pflanze als freie Verbindungen vorliegenden Phenole befinden, während im Methanolextrakt die sorptiv oder in einer anderen Form gebundenen Phenolcarbonsäuren und deren Umwandlungsprodukte sowie eventuell vorhandene Ketosäuren enthalten waren. Im Wassereextrakt waren die als Folge der CO_2 -Fixierung gebildeten markierten Produkte wie Aminosäuren, lösliche Proteine und Zucker gelöst.

Bei der Extraktion der Pflanzen mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln ergab sich, daß die Hauptmenge der extrahierbaren Aktivität nach Inkubation mit Carboxyl- ^{14}C -markierter p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure oder Syringasäure sich im Methanolextrakt befand. Daraus kann geschlossen werden,

sich nur durch 8-Oxychinolin und Diäthylthiocarbamat hemmen, nicht durch 2,2-Dipyridyl. Dies läßt darauf schließen, daß das Enzym Kupfer und nicht Eisen als prosthetische Gruppe enthält.

In keimenden Salatsamen fand MAYER (1961, 1962) eine lösliche und eine an Mitochondrien gebundene Phenolase. Die Enzyme wurden gegen 4-Methylbrenzcatechin (I) Dopa (=Dihydroxyphenylalanin) (II), Kaffeesäure (III), p-Kresol (IV), Tyrosin (V), Chlorogensäure (VI) und Chinol (VII) getestet. I, II und III wurden durch alle Enzympräparate oxydiert, während das an Mitochondrien gebundene Enzym nicht in der Lage war IV, V, VI und VII zu oxydieren.

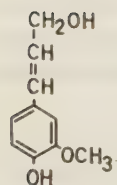
Aus den Untersuchungen über den Einbau der p-Hydroxybenzoesäure in die Hydrochinonkomponente des Arbutins folgerte ZENK (1964b), daß die Überführung der p-Cumarsäure in p-Hydrochinon über eine oxydative Decarboxylierung verläuft. Eine Hydroxylgruppe verdrängt die Carboxylgruppe, die als Kohlendioxid abgespalten wird.

Auch wird die Ligninbildung aus den Ligninalkoholen nach der Vorstellung von FREUDENBERG (1962) durch Oxydation mit Phenoloxydase bewirkt, wie dies in 1.21 beschrieben ist.

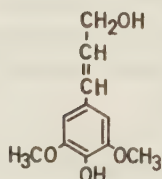
1.21 Ligninbildung und Ligninabbau durch Mikroorganismen

Das Lignin der lebenden Pflanzen ist ein Polymeres, das durch Oxydation verschieden methoxylierter Vinylalkohol-Monomeren entsteht. Coniferenlignin sowie das Lignin anderer Spezies entsteht vornehmlich durch Oxydation des Coniferylalkohols. Sinapinalkohol, als Bestandteil des Lignins der Laubhölzer, kommt nur vergesellschaftet mit Coniferylalkohol vor. Ein Mischpolymerisat des p-Cumaralkohols mit den anderen beiden Ligninalkoholen stellt das Lignin der Gramineen dar (de STEVENS und NORD 1953). In p-Stellung zur Vinyl-Alkohol-Seitenkette

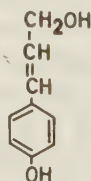
ist der Phenylring dieser Ligninalkohole durch eine freie Hydroxylgruppe substituiert; außerdem können eine oder zwei Methoxylgruppen in o-Stellung zur Hydroxylgruppe vorhanden sein.



Coniferyl-



Sinapin-



Cumar - alkohol

Abb. 4: Monomere Bausteine des Lignins

In Makromolekül des Lignins sind nach Untersuchungen von FREUDENBERG (1962, 1964) sowie KRATZL und BILLEK (1956) die einzelnen monomeren Phenylpropaneinheiten durch Äther- und/oder durch Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zusammengefügt. Die verschiedenen Bindungsarten werden beim Abbau des Lignins durch Mikroorganismen und beim chemischen Abbau des Lignins gespalten.

daß die genannten Phenolcarbonsäuren nur in geringer Menge frei vorliegen, sondern vielmehr adsorptiv gebunden oder umgewandelt sind. Eine Ausnahme bildet dabei die p-Hydroxybenzoesäure. Von der insgesamt in den Sproß aufgenommenen Aktivität war 25 % mit Aether extrahierbar, die ausschließlich in der p-Hydroxybenzoesäure-Bande lokalisiert war. Auffallend war dabei, daß dieser Befund nur für den Sproß zutraf, während sich im Aetherextrakt der Wurzel wie bei der Vanillin- und Syringasäure chromatographisch keine freie Säure auffinden ließ.

Bei der Charakterisierung der Methanolextrakte mittels der Dünnschichtchromatographie und UV-Spektroskopie sowie durch Messung der Aktivität in den Eluaten der einzelnen Banden der Chromatogramme zeigte sich, daß die Aktivität der aufgenommenen p-Hydroxybenzoesäure sich im Sproß zu 50,9 % und in der Wurzel zu 56,8 % in dieser Verbindung befand. Für Vanillinsäure ergaben sich die Werte: im Sproß 27,4 % und in der Wurzel 26,8 % und für Syringasäure im Sproß 18,4 % und in der Wurzel 36,5 %.

Neben diesen Banden wiesen die Startflecke sowie bei den mit p-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure behandelten Pflanzen im Wurzelextrakt die entsprechenden Methylesterbanden der nicht hydrolysierten Extrakte Aktivität auf. Nach der Hydrolyse der eluierten Startflecke von Chromatogrammen nicht hydrolysierter Sproß- und Wurzelextrakte mit 2 n H_2SO_4 traten bei nochmaliger Chromatographie neben den Banden der applizierten Phenolcarbonsäuren die Methylesterbanden dieser Verbindungen auf. Die Methylester wurden bei einer Hydrolyse mit 6 n HCl weitgehend verseift. Daraus konnte zunächst geschlossen werden, daß die Phenolcarbonsäuren und ihre Ester in der Pflanze in glycosidisch gebundener Form vorliegen.

In den unter 3.223 beschriebenen Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, daß die Bildung der Methylester eine Folge

der Extraktion mit Methanol war. Wie gezeigt wurde, lagen die Methylester ursprünglich als Glucoseester in der Pflanze vor und entstanden durch Extraktion mit Methanol durch eine Umesterung. Die Umesterung verlief aber nicht quantitativ. Im Methanolextrakt der Pflanzen konnte neben den Methylestern und freien Säuren noch ein Großteil der Aktivität im Startfleck nachgewiesen werden. Nach der Hydrolyse des Startfleckes mit $2\text{ n H}_2\text{SO}_4$ wurde weiterer Methylester sowie freie Säure freigesetzt. Da die Methylester durch eine Umesterung der Glucoseester entstehen, spricht dieses Ergebnis dafür, daß auch die Glucoseester der Phenolcarbonsäuren, teilweise oder vollständig, als Glucoside vorliegen. Im Methanolextrakt von Pflanzen, denen p-Hydroxybenzoesäure appliziert worden war, konnte neben dem Methylester noch p-Hydroxybenzoylglucose nachgewiesen werden.

Ebenso ergab die enzymatische Hydrolyse der Methanolextrakte mittels einer β -Glucosidase, die sowohl Glucoside als auch die Glucoseester spaltet, daß auf den Chromatogrammen neben den Phenolcarbonsäuren die Methylester als aktive Verbindungen auftraten. Da die Methylester in der Pflanze als Glucoseester vorlagen, ergab dieser Befund ebenfalls, daß auch die Glucoseester in der Pflanze z.T. glucosidisch gebunden waren.

Nach diesen Befunden waren in den Methanolextrakten von Pflanzen, die eine Zugabe von Carboxyl- ^{14}C -markierter p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure bzw. Syringasäure zur Nährlösung erhielten, die applizierten Verbindungen, die Glucoseester und Glucoside dieser Verbindungen als auch die Glucoseester-Glucoside der Phenolcarbonsäuren als markierte Substanzen nachweisbar. Es traten keine weiteren markierte, niedermolekulare Umwandlungsprodukte dieser Phenolcarbonsäuren nach der Aufnahme und Translokation in den Pflanzen auf.

Diese Ergebnisse stehen mit Untersuchungen von EL-BASYOUNI, CHEN, IBRAHIM, NEISH und TOWERS (1964) in Einklang, die nach

Infiltration von Carboxyl- ^{14}C -markierter Vanillinsäure in Blattsegmente von vier verschiedenen Pflanzenspezies, außer in der Vanillinsäure selbst keine weitere Aktivität feststellen konnten, während p-Hydroxybenzoesäure in sehr geringem Ausmaß (1 %) zu Protocatechusäure hydroxyliert wurde. Nach den eigenen Untersuchungen und den Befunden von ZENK und MÜLLER (1964) sowie HARBORNE und CORNER (1961) war jedoch eine Hydroxylierung oder Methoxylierung von $\text{C}_6\text{-C}_1$ -Phenolen gering und die von den Pflanzen aufgenommenen Phenole wurden sehr rasch in Glucoseester oder Glucoside festgelegt und waren damit einer evtl. Umwandlung kaum zugänglich.

Im Gegensatz zu den genannten Untersuchungen stehen die Versuchsergebnisse von EVEN-HAIM (1963), der die Aufnahme von Carboxyl- ^{14}C und Methoxyl- ^{14}C -markierter Vanillinsäure untersuchte. Der Autor isolierte aus dem Methanolextrakt der Sprosse von Weizenkeimpflanzen eine Substanz, die aufgrund der Elektronen- und Infrarotspektren sowie des Schmelzpunktes als p-Hydroxybenzoesäure angesehen wurde. Diese war im Falle der carboxylmarkierten Vanillinsäure aktiv und im Falle der methoxylmarkierten inaktiv.

In den durchgeführten Untersuchungen mit Vanillinsäure konnte eine Demethoxylierung, wie sie von EVEN-HAIM festgestellt wurde, nicht gefunden werden. EL-BASYOUNI et. al. (1964) deuteten an, daß nach der Fütterung von Weizenpflanzen mit C_3 -markierter Sinapinsäure Vanillin- und p-Hydroxybenzoesäure auftraten. Es geht jedoch aus ihren Angaben nicht hervor, ob die Umwandlung der Vanillinsäure in p-Hydroxybenzoesäure erfolgt oder - wahrscheinlicher - eine Umwandlung der Sinapinsäure in p-Cumarsäure und dann erst in p-Hydroxybenzoesäure. Nach der Auffassung von ZENK (1966) findet eine Umwandlung der p-hydroxylierten Benzoesäuren untereinander durch Hydroxylierung, Methylierung oder Methoxylierung sowie durch Dehydroxylierung, Demethoxylierung unter normalen Bedingungen in der Pflanze nicht statt, sondern diese Reaktionen verlaufen auf der Stufe der

Zimtsäuren.

Eine Reduktion der Phenolcarbonsäuren zu den entsprechenden Aldehyden oder Alkoholen, wie sie FARMER, HENDERSON und RUSSEL (1959) und ZENK (1965a) bei *Polystictus versicolor* gefunden haben, konnte nicht festgestellt werden. HIGUCHI und BROWN (1963) berichteten, daß in Weizenpflanzen Coniferylalkohol und Coniferylaldehyd aus Sinapinsäure gebildet wurde. Die Untersuchung über die Umwandlung verschiedener Vorstufen wie Ferulasäure oder Vanillinsäure in Vanillin (ZENK 1965b) zeigte als Ergebnis, daß Vanillinsäure von *Vanilla planifolia* nur zu 4 % zu Vanillin reduziert werden konnte, während Ferulasäure $O^{14}CH_3$ zu 27 % in Vanillin umgewandelt wurde. Die Reduktion der Phenolcarbonsäuren zu den entsprechenden Aldehyden und Alkoholen scheint in der Pflanze nicht verifiziert zu sein und konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet werden.

Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis der Untersuchungen mit Carboxyl- ^{14}C -markierten Phenolcarbonsäuren war der relativ hohe Anteil an aktivem Kohlendioxid, der von den Pflanzen freigesetzt wurde. Der von den Pflanzen als Kohlendioxid freigesetzte Anteil betrug bei p-Hydroxybenzoesäure ca. 7 %, bei Vanillinsäure 35 % und bei Syringasäure 45 % der insgesamt von der einzelnen Pflanze aufgenommenen Aktivität. EVEN-HAIM (1963) fand in seinen Untersuchungen, daß von der Carboxyl- ^{14}C -markierten Vanillinsäure 5,9 % der aufgenommenen Aktivität als Kohlendioxid von den Pflanzen ausgeschieden wurde. Wie aus den Untersuchungen 3.22 und 3.3 zu entnehmen ist, fand eine nennenswerte Abspaltung der Carboxylgruppe bei Carboxyl- ^{14}C -markierten Phenolcarbonsäuren nur dann statt, wenn in p-Stellung zur Carboxylgruppe eine Hydroxylgruppe stand. Eine Substitution des Ringes durch weitere Hydroxyl- und Methoxylgruppen in o-Stellung zu der p-ständigen Hydroxylgruppe erhöhte die Abspaltung der Carboxylgruppe, so daß bei der Aufnahme von Syringa- und Sinapinsäure die Pflanze die höchste

Abspaltungsrate von Kohlendioxid aufwies. War hingegen die p-ständige Hydroxylgruppe veräthert, so fand nur eine sehr schwache Abspaltung der Carboxylgruppe statt. Aus Methoxyl-¹⁴C-markierten Verbindungen wurde auch nur in sehr geringem Umfang Kohlendioxid freigesetzt, so daß eine rasche Demethylierung dieser Verbindungen in der Weizenpflanze nicht als wahrscheinlich anzunehmen ist.

Die Warburg-Versuche zeigten weiterhin, daß die Wurzelstücke besonders bei den weniger substituierten Verbindungen gegenüber den Sproßstücken wesentlich mehr Kohlendioxid in der Zeiteinheit freisetzen, so daß man bei der Aufnahme der Phenolcarbonsäuren durch die Wurzeln diese Organe als Ort der hauptsächlichsten Decarboxylierung annehmen darf, jedoch besitzt auch der Sproß das Vermögen, die Carboxylgruppe dieser Verbindungen abzuspalten.

Die Abspaltung der Carboxylgruppe ist wahrscheinlich als eine Folgereaktion einer Phenoloxydaseeinwirkung zu werten, wie sie von HAIDER, LIM und FLAIG (1962, 1964) und LIM (1965) bei der Oxydation von Carboxyl-¹⁴C-markierten Phenolcarbonsäuren und Phenolacrylsäuren mittels Phenoloxidasen aus *Polystictus versicolor* beobachtet wurde. Bei einer Oxydation von Phenolcarbonsäuren durch Abspaltung von Wasserstoffatomen aus den Hydroxylgruppen entstehen Radikale und Chinone, die eine Instabilität der Bindung der Carboxylgruppe bewirken, so daß sie als Kohlendioxid freigesetzt wird. Die Autoren stellten eine ähnliche Abhängigkeit der Abspaltung der Carboxylgruppe von den am Ring substituierten Hydroxyl- und Methoxylgruppen fest, wie sie in den unter 3.3 beschriebenen Warburg-Versuchen dargelegt wurde, so daß die Vermutung gestärkt wird, daß in Weizenpflanzen die Abspaltung der Carboxylgruppe ebenfalls eine Folgereaktion einer Phenoloxydaseeinwirkung ist. Die bei einer solchen Reaktion entstehenden Chinone und Radikale sind instabile Verbindungen, die teilweise zu Polymerisaten zusammen-treten. Da in der Pflanze zahlreiche reduzierende Systeme vor-

handen sind, wie DPNH, TPNH oder Ascorbinsäure, könnten die entstandenen Chinone zu Hydrochinone reduziert werden und als solche in den Pflanzen vorliegen und weiteren Umwandlungen in der Pflanze unterliegen. WOSILAIT und NASON (1954) zeigten, daß die Chinonreduktase, die sie aus Erbsenkeimpflanzen isolierten, DPNH abhängig ist, ebenfalls eine von FRINNER (1960) aus Schweineleber isolierte Chinonreduktase. Ascorbinsäure ist z.B. in der Lage, Chinone zu Phenolen zu reduzieren. Solange Ascorbinsäure mit Chinonen in der Zelle in Berührung steht, werden diese reduziert. Die Verfärbung geriebener Äpfel tritt erst ein, wenn zuvor alle Ascorbinsäure verbraucht ist (PONTING und JOSLYN 1948). Möglicherweise stellt auch im normalen Geschehen der Zelle die Ascorbinsäure eine Art Reduktionsreserve bzw. einen Reduktionspuffer dar, die beim Fehlen anderer reduzierender Systeme oxydierte Phenole wieder reduziert und damit eine Ansammlung der für das lebende Plasma toxischen Chinone verhindert (PAECH 1950).

Die von ZENK (1964b) in seinen Untersuchungen über den Einbau der p-Hydroxybenzoesäure in die Hydrochinonkomponente des Arbutins postulierte oxydative Decarboxylierung der p-Hydroxybenzoesäure zum Hydrochinon, ließe sich ebenfalls unter dem Gesichtspunkt einer Phenolaseeinwirkung diskutieren. So erhielten FLAIG und HAIDER (1961) bei der Einwirkung von Laccase aus *Polystictus versicolor* unter gleichzeitigen reduzierenden Bedingungen aus Protocatechusäure Hydroxyhydrochinon und aus Vanillinsäure Methoxy-p-Hydrochinon bzw. das dimere Hydrochinon dieser Verbindungen.

COSGROVE et. al. (1952) konnten z.B. aus fermentierten Weizenkeimen Methoxy- und 2,6-Dimethoxybenzochinon als Decarboxylierungsprodukte der Vanillin- und Syringasäure isolieren, während de JONG et. al. (1953) das Glycosid des Methoxyhydrochinons in Weizenkeimen fanden.

Bei den Phenoloxydasen handelt es sich um einen Komplex mehrerer Enzyme. Ihr Vorkommen und ihre Wirkung wird noch Gegenstand weiterer näherer Untersuchungen sein.

Das als Folge der Phenoloxydaseeinwirkung freigesetzte und von den Pflanzen ausgeschiedene Kohlendioxid wurde zum überwiegenden Teil in das umgebende Außenmedium abgegeben. Wie aus den unter 3.4 beschriebenen Untersuchungen jedoch hervorgeht, wurde das Kohlendioxid in der Pflanze möglicherweise endogen abgefangen oder aus der Nährlösung durch die Wurzeln wieder resorbiert. Die Aufnahme des Kohlendioxids sowohl im gasförmigen Zustand als auch als HCO_3^- -Ion ist bereits mehrfach untersucht worden. Die Fixierung des Kohlendioxids ist ein aktiver Einbau in organische Substanzen, nämlich primär eine Carboxylierung der Phosphoenolbrenztraubensäure (PEB) zu Oxalessigsäure unter Mitwirkung der PEB-Carboxylase und sekundär durch Umwandlungen in andere organische Säuren des Tricarbonsäurecyclus und die hieraus entstehenden Syntheseprodukte wie Aminosäuren etc.

Wie aus den Untersuchungen zu entnehmen ist, wurde das bei der Abspaltung der Carboxylgruppe der Phenolcarbonsäuren freiwerdende Kohlendioxid durch Fixierung über den Tricarbonsäurecyclus in geringem Ausmaß in Aminosäuren festgelegt. Im Verhältnis zum freigesetzten Kohlendioxid wurden annähernd 1,5 % von der Pflanze zur Synthese von Aminosäuren genützt. Die Hauptaktivität ist dabei in der Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure lokalisiert, die als direkte Abkömmlinge der α -Ketoglutarsäure bzw. der Oxalessigsäure durch Aminierung gebildet werden. In der Glutaminsäure und Asparaginsäure waren 4-5 % der insgesamt in den Sproß aufgenommenen Aktivität festgelegt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von POEL (1953), der nach der Fixierung von Kohlendioxid durch Wurzeln von Roggenpflanzen im Alkoholextrakt Aktivität in der Äpfelsäure, Citronensäure und α -Ketoglutarsäure als Glieder des Tricarbonsäurecycluses und in

der Glutaminsäure, der Asparaginsäure, dem Glutamin, dem Asparagin sowie in Serin und Tyrosin feststellen konnte.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, daß die aufgenommenen Phenolcarbonsäuren in der Pflanze entweder sehr rasch in Glycoside und Glucoseester festgelegt wurden und somit zunächst einer weiteren Umwandlung in der Pflanze nicht mehr zugänglich waren, oder sie unterlagen in der Pflanze einem oxydativen Abbauprozess, der sich vornehmlich in der Abspaltung der Carboxylgruppe dieser Verbindungen bemerkbar machte.

ASEN und EMSWELLER (1962) diskutierten die Bildung der Glucoseester als einen Entgiftungsmechanismus der Pflanzen. Sie isolierten aus einer inter-spezifischen Hybride von *Lilium speciosum* Thumb. "Album" Ferulasäure, Sinapinsäure und p-Cumarsäure sowie die Glucoseester dieser Verbindungen. Bei dieser Hybride lagen im Samen annähernd 60 % des gesamten Gehaltes an Ferulasäure als freie Säure vor, während der Rest von 40 % mit Glucose verknüpft war. Hier fand keine normale Keimung der Samen statt, oder die Pflanzen starben bereits als Keimlinge ab. Bei einer anderen Hybride lagen nur 6 % als freie Ferulasäure im Samen vor, diese keimten normal. Die Verfasser schrieben die anomale Physiologie der inter-spezifischen Hybride einer möglichen Hemmung des Entgiftungsmechanismus durch Esterbildung zu.

GORIS (1964) untersuchte vergleichsweise die Wirkung von Vanillin und Vanillosid auf die Entwicklung von Möhrengewebe *in vitro*. Der Autor ging von der Annahme aus, daß die Glycosidbildung ebenfalls ein Entgiftungsmechanismus darstellt. Das Möhrengewebe wurde in Nährlösung gehalten, der 10^{-7} bis 10^{-3} Mol Vanillin bzw. Vanillosid zugesetzt war. Bei einem Zusatz von Vanillin in 10^{-3} molarer Konzentration zeigten sich nekrotische Stellen, die bei Zugabe von Vanillosid unterblieben.

DEAR und ARONOFF (1965) beobachteten bei Blättern von Sonnenblumen, die unter Bormangel gehalten wurden, nekrotische Bezirke, die blau-weiße Fluoreszenz aufwiesen und durch einen hohen Gehalt an freier Kaffeesäure hervorgerufen wurden. Bei nekrotischen Pflanzen war der Gehalt von Kaffeesäure zu Chlorigensäure das 4-fache im Vegetationspunkt und das 10-fache in Blättern gegenüber den normalen Pflanzen. Es wurde daher angenommen, daß die Gewebenekrose durch überschüssige freie Kaffeesäure hervorgerufen wurde, die das Gewebe auf bisher unbekannte Weise zerstörte.

Aus diesen Angaben ist zu entnehmen, das Phenolcarbonsäuren als freie Säuren für die Pflanzen toxisch sind. Durch Umwandlung der Säuren in Glucoseester und Glucoside werden sie in eine für die Pflanze unschädliche Form überführt. Eine weitere Art eines Entgiftungsmechanismus könnte die Oxydation der Phenole durch Phenoloxidasen darstellen, wobei die Carboxylgruppe der Phenolcarbonsäuren abgespalten wird. Die dabei gebildeten Chinone können weiteren Umwandlungen in der Pflanze unterliegen und z.B. mit Aminosäuren oder Protein (HAIDER, FREDERICK und FLAIG 1965) reagieren, so daß sie in der Zelle festgelegt sind.

Die zunächst als Glucoside oder Glucoseester in der Pflanze unschädlich gemachten Phenolcarbonsäuren könnten aber durch Glucosidasen usw. von der Pflanze wieder freigesetzt werden. Dadurch wäre eventuell eine laufende Beeinflussung des Stoffwechsels möglich, wenn sie immer in geringen Konzentrationen freigesetzt werden. Unter bestimmten Bedingungen könnte es so zu einer erhöhten Produktion pflanzlicher Substanz kommen.

5. Zusammenfassung

=====

In der vorliegenden Arbeit wurde unter sterilen Bedingungen die Aufnahme von phenolischen Ligninspaltstücken mit Hilfe Carboxyl- ^{14}C -markierter p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure sowie Syringasäure durch die unbeschädigte Pflanzenwurzel quantitativ untersucht.

Die Versuchsergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die applizierten Phenolcarbonsäuren wurden von den Pflanzen aufgenommen und verteilten sich über die gesamte Pflanze. Auf den Autoradiogrammen der Pflanzen war zu erkennen, daß die markierten Verbindungen im Sproß besonders in den während der Inkubationszeit gebildeten Pflanzenteilen angereichert waren. Die Blattnerven hoben sich als leitendes Gewebe auffällig vom übrigen Gewebe ab. Die hohe Aktivität in der Wurzel ließ darauf schließen, daß ein Teil der Phenolcarbonsäuren an der Wurzeloberfläche adsorptiv gebunden war.
2. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu einer vermehrten Aufnahme der markierten Phenolcarbonsäuren in die Pflanze, wobei die Aufnahme vom pH-Wert der Nährlösung abhängig war. Die maximale Aufnahme in den Sproß erfolgte bei einem pH-Wert der Nährlösung, der dem pK-Wert der applizierten Substanz entsprach.
3. Eine Extraktion der Pflanzen mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln (Aether, Methanol, Wasser) zeigte, daß sich die Hauptmenge der Aktivität in den Methanolextrakt überführen ließ. Es wurde der Nachweis erbracht, daß die Aktivität in den Pflanzen in den applizierten Phenolcarbonsäuren sowie in den Glucosiden und Glucoseestern dieser Verbindungen lokalisiert war.

4. Durch Extraktion mit Methanol erfolgte eine teilweise Umesterung der Glucoseester, so daß Methylester isoliert wurden. Da nach der Hydrolyse mittels einer β -Glucosidase, die sowohl Glucoside als auch Glucoseester spaltet, aus den Startflecken nicht hydrolysierter Extrakte neben den Phenolcarbonsäuren die Methylester dieser Verbindungen freigesetzt werden konnten, konnte durch die zuvor stattgefundene Umesterung der Glucoseester aber nachgewiesen werden, daß auch die Glucoseester in der Wurzel teilweise und im Sproß vollständig als Glucoside vorliegen.

5. Aus den Carboxyl- ^{14}C -markierten Phenolcarbonsäuren wurde von den Pflanzen ein relativ hoher Anteil an markiertem Kohlendioxid freigesetzt. Aus den durchgeführten Warburg-Versuchen ergab sich, daß hauptsächlich eine Abspaltung der Carboxylgruppe der Phenolcarbon- und Phenolacrylsäuren stattfand, während das übrige Kohlenstoffgerüst verhältnismäßig stabil war. Eine nennenswerte Abspaltung der Carboxylgruppe war nur dann zu beobachten, wenn in p-Stellung zu ihr eine Hydroxylgruppe stand. Eine Substitution des Ringes durch weitere Hydroxyl- und Methoxylgruppen in Nachbarstellung zu der p-ständigen Hydroxylgruppe erhöhte die Abspaltung der Carboxylgruppe. Aus Methoxyl- ^{14}C - oder in anderen Gruppen markierten Verbindungen wurde nur in sehr geringem Umfang aktives Kohlendioxid-freigesetzt.

6. Die Warburg-Versuche zeigten weiterhin, daß die Wurzel gegenüber dem Sproß wesentlich mehr Kohlendioxid in der Zeiteinheit freisetzte, so daß man die Wurzeln als den hauptsächlichsten Ort der Decarboxylierung annehmen darf. Die Abspaltung der Carboxylgruppe wurde als eine Folge der Oxydation der Phenolcarbonsäuren durch Phenoloxidasen diskutiert.

7. Das bei der Abspaltung der Carboxylgruppe der Phenolcarbonsäuren freiwerdende Kohlendioxid wurde durch Fixierung

Über den Tricarbonsäurecyclus in geringem Ausmaß in Aminosäuren festgelegt. Die Hauptaktivität war dabei in der Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure als direkten Abkömmlingen der Oxal-essigsäure bzw. der *L*-Ketoglutarsäure gefunden worden.

8. Aus einer zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse ergab sich die Schlußfolgerung, daß die Pflanze die aufgenommenen Phenolcarbonsäuren, die für die Pflanze toxisch sind, durch Bildung von Glucosiden und Glucoseestern in eine unschädliche Form überführte oder sie durch Phenoloxydaseeinwirkung oxydierte, die sich in der Abspaltung der Carboxylgruppe dieser Verbindungen bemerkbar machte.

Literaturnachweis

- ADAMS, G.A. und A.E. CASTAGNE: Holocelluloses from straw.
Canad. J. Res., Sect. B 26, 325 (1948)
- ASEN, S. and S.L. EMSWELLER: Hydroxycinnamic acids and their
glucose esters in hybrids of liliun species
and their relation to germination.
Phytochemistry 1, 169-174 (1962)
- AULIN-ERDTMAN, G. und L. HEGBOM: Spectrographic contributions to
lignin chemistry. VII. The ultra-violet absorp-
tion und ionization AE-curves of some phenols.
Svensks Papperstidn. 60, 671-681 (1950)
- BEDRI, A.A. et.al.: Assimilation of bicarbonate by roots of
different plant species.
Soil Sci. 89, 257 (1960)
- BIRCH, A.J. and F.W. DONOVAN: Studies in relation to biosyn-
thesis. I. Some possible routes to derivati-
ves of orcinol and phloroglucinol.
Austral. J. Chem. 6, 360 (1953)
- BIRCH, A.J., R.A. MASSY-WESTROPP and C.J. MOYE: Studies in
relation to biosynthesis. V. The structures
of some natural quinones.
Austral. J. Chem. 8, 529 (1955)
- BIRKHOFER, L., C. KAISER, W. NOVERTNE und U. THOMAS: Natürlich
vorkommende Zuckerester von Phenolcarbonsäuren.
Z. Naturforsch. 16b, 249-251 (1961)
- BIRKHOFER, L. und C. KAISER: Petunosid, ein acyliertes Flavin
aus Petunien.
Z. Naturforsch. 17b, 279-280 (1962)
- BIRT, L.M. and F.J.R. HURD: Kinetic aspects of the uptake of
amino acids by carrot tissue.
Biochem. J. 70, 286-292 (1958)
- BOGEN, H.J.: Zellphysiologie und Protoplasmatik.
Fortschr. Bot. 22, 155 (1959)
- BOGERT, M.J. and B.B. COYNE: Syringic acid and its derivatives.
J. Amer. chem. Soc. 51, 569-576 (1929)
- BÖRNER, H.: Untersuchungen über phenolische Verbindungen aus
Getreidestroh und Getreiderückständen.
Naturwissenschaften 42, 583 (1955)
- BRITT, E.M. and Ph. GERHARDT: Lipide requirements for the
growth of pleuropneumonia-like organisms.
J. Bacteriol. 76, 281-287 (1958)

- BRUCKER, W. und W. DREHMANN: Zur Phenolcarbonsäurebildung von *Phycomyces blakesleeanus* aus ^{14}C -markierten Substraten.
Arch. Mikrobiol. 30, 396-408 (1958)
- BUNGENBERG de JONG, H.L., W.J. KLAAR and J.A. Vliegenthart: A precursor of methoxy-para-benzoquinone in wheat germ.
Nature 172, 402-403 (1953)
- BURGER, M., L. HEJMOVA and A. KLEINZELLER: Transport of mono- and disaccharides into yeast cells.
Biochem. J. 71, 233-242 (1959)
- CHRISTEWA, A.L.: Anteil der Huminsäuren und anderer organischer Stoffe an der Ernährung der höheren Pflanzen und die agronomische Bedeutung dieser Ernährungsweise.
Ref. Landwirtsch. Zbl. II, 920 (1956)
- CLARK, N. und E. ROLLER: Stimulation of *Lemna major* by organic matter.
Soil Sci. 31, 299-304 (1931)
- COHEN, G.N. and J. MONOD: Bacterial permeases.
Bacteriol. Rev. 21, 169-194 (1957)
- COSGROVE, D.J., D.G.H. DANIELS, E.N. GREER, J.B. HUTCHINSON, T. MOREN and J.K. WHITEHEAD: Isolation of Methoxy- and 2,6-Dimethoxy-p-benzoquinone from fermented wheat germ.
Nature (London) 169, 966-967 (1952)
- DEAR, S. and S. ARONOFF: Relative kinetics of chlorogenic- and caffeic acids during the onset of boron deficiency in sunflower.
Plant Physiol. 40, 458-459 (1965)
- EL-BASYOUNI, S. and G.H.N. TOWERS: The phenolic acids in wheat. I. Changes during growth and development.
Canad. J. Biochem. 42, 203-210 (1964)
- EL-BASYOUNI, S., D. CHEN, R.K. IBRAHIM, A.C. NEISH and G.H.N. TOWERS: The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants.
Phytochemistry 3, 485-492 (1964)
- EVEN-HAIM, A.: Techn. Meeting on the use of isotopes in soil organic studies, Braunschweig-Völkenrode Sept. 1963, Som 21.
Etude sur l'absorption de la matière organique par les plantes supérieures au moyen de leurs racines.
Essais à l'acide vanillique contenant carbon radioactif.

- FARMER, V.C., M.E.K. HENDERSON and J.D. RUSSEL: Reduction of certain aromatic acids to aldehydes and alcohols by *Polystictus versicolor*.
Biochim. Biophys. Acta 25, 202-211 (1959)
- FISCHER, E. und R. KADISADE: Verwendung der acetylierten Phenolcarbonsäuren für die Synthese von Depsiden.
Ber. dtsch. chem. Ges. 521, 72 (1919)
- FISCHER, E. und M. BERGMANN: Über das Tannin und die Synthese ähnlicher Stoffe.
Ber. dtsch. chem. Ges. 52, 829 (1919)
- FLAIG, W. und H. OTTO: Zur Kenntnis der Huminsäuren. III. Mitteilung. Untersuchungen über die Einwirkung einiger Chinone als Modellsubstanzen der Auf- und Abbauprodukte von Huminsäuren sowie einiger Redoxsubstanzen auf das Wachstum von Pflanzenwurzeln.
Landwirtsch. Forsch. 3, 66-89 (1951)
- FLAIG, W. und E. SAALBACH: Zur Kenntnis der Huminsäuren. X. Mitteilung. Über den Einfluß des Thymohydrochinons als Modellsubstanz von Vorstufen bzw. Abbauprodukten von Huminsäuren auf das Wurzelwachstum von Sommerweizen.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 71, 208-215 (1955)
- FLAIG, W. und E. SAALBACH: Zur Kenntnis der Huminsäuren. XII. Mitteilung. Untersuchungen über den Einfluß des Thymohydrochinons als Modellsubstanz von Vorstufen bzw. Abbauprodukten von Huminsäuren auf die Atmung von Getreide.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 72, 1-7 (1956)
- FLAIG, W., K. SCHARRER und G. SCHOLL: Zur Kenntnis der Huminsäuren. XIV. Mitteilung. Über den Einfluß von Thymohydrochinon als Modellsubstanz von Humusstoffen auf den Kohlehydratstoffwechsel von Getreide.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 76, 193 (1957)
- FLAIG, W.: Chemie der Humusstoffe.
Suomen Kemistilehti 33, 229-251 (1960)
- FLAIG, W. und K. HAIDER: Reaktionen mit oxydierenden Enzymen aus Mikroorganismen.
Planta med. 2, 123-139 (1961a)

- FLAIG, W. und K. HAIDER: Die Verwertung phenolischer Verbindungen durch Weißfäulepilze.
Arch. Mikrobiol. 40, 212-223 (1961b)
- FLAIG, W. und H. SÜCHTIG: Einfluß organischer Stoffe auf die Aufnahme anorganischer Ionen.
Agrochimica 3, 251-264 (1962)
- FREUDENBERG, K.: Forschung am Lignin.
Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 20, 41 (1962)
- FREUDENBERG, K.: Entwurf eines Konstitutionsschemas für das Lignin der Fichte.
Holzforsch. 18, 3-9 (1964)
- FRINNER, M.: Isolierung und Eigenschaften einer DPNH-Chinon-reduktase aus Schweineleber.
Biochem. Z. 332, 522-541 (1960)
- FÜHR, F.: Untersuchungen zur Aufnahme von Kohlendioxid und Strohabbauprodukten durch die Pflanzenwurzel.
Diss. d. Landwirtschaftl. Fak. d. Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn (1962)
- FÜHR, F. und D. SAUERBECK: Über die Aufnahme und Translokation ¹⁴C-markierter organischer Rotteprodukte bei Raphanus sativus.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 105, 136-144 (1964)
- FÜHR, F. und D. SAUERBECK: Die räumliche und chemische Verteilung durch die Wurzel aufgenommener organischer Rotteprodukte bei Daucus carota.
Landwirtsch. Forsch. 19, 3-15 (1965)
- GEISSMANN, T.A. und E. HINREINER: Theories of the biogenesis of flavonoid compounds.
Bot. Rev. 18, 77-164 (1952)
- GERRETSEN, F.G.: Das Katadyn-Verfahren zur sterilen Kultur höherer Pflanzen.
Planta 23, 593-603 (1935)
- GORDON, S.A. und I.G. PALEG: Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols.
Plant Physiol. 36, 838-845 (1961)
- GORIS, A.: Vergleichsweise Wirkung von Vanillin (I) und Vanillosid (II) auf die Entwicklung von Möhrengewebe in vitro.
Ann. pharmac. franc. 22, 217-222 (1964)

- GRAF, G.E. and S. ARONOFF: Carbondioxide fixation by roots.
Science 121, 211-212 (1955)
- GRISDALE, S.K. and G.H.N. TOWERS: Biosynthesis of arbutin
from some phenylpropanoid compounds in
Tyrus communis.
Nature (London) 188, 1130-1131 (1960)
- GRISEBACH, H. und K.O. VOLLMER: Untersuchungen zur Biosyn-
these des Salicylsäuremethylesters in
Gaultheria procumbens.
Z. Naturforsch. 18b, 753 (1963)
- GUMINSKI, S.: Mechanismus und Bedingungen der physiologischen
Wirkung von Humusstoffen auf den pflanzlichen
Organismus.
Ref. Landwirtsch. Zbl. II, 1840 (1958)
- HAIDER, K.: Untersuchungen über eine Bakterienprotease und
deren Anwendung zur Strukturaufklärung von
Eiweißen.
Diplomarbeit der Univ. Frankfurt/Main (1958)
- HAIDER, K., S.U. LIM und W. FLAIG: Untersuchungen über die
Einwirkung von Mikroorganismen auf ¹⁴C-mar-
kierte phenolische Verbindungen.
Landwirtsch. Forsch. 15, 1-9 (1962)
- HAIDER, K., S.U. LIM und W. FLAIG: Experimente und Theorien
über den Ligninabbau bei der Weißfäule des
Holzes und bei der Verrottung pflanzlicher
Substanz im Boden.
Holzforsch. 18, 81-88 (1964)
- HAIDER, K., L.R. FREDERICK und W. FLAIG: Reactions between
amino acids compounds and phenols during
oxydation.
Plant and Soil 22, 49-64 (1965)
- HAIDER, K.: Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von
Lignin.
Zbl. Bakteriöl. I. Abt. 198, 308-316 (1965)
- HAIDER, K. und S. LIM: Darstellung von Coniferyl- und Sinapin-
alkohol, markiert in den Methoxylgruppen durch
¹⁴C.
J. Lab. Com. I, No.4, 294-299 (1965)
- HAIDER, K.: Synthese von ¹⁴C-ringmarkierten phenolischen
Ligninspaltstücken und Ligninalkoholen aus
Ba¹⁴CO₃.
J. Lab. Com. II, No.2, 174-183 (1966)

- HALPAAP, H.: Präparative Dünnschichtchromatographie.
Chemie-Ing.-Techn. 35, 488-493 (1963)
- HARBORNE, J.B. and J.J. CORNER: Plant Polyphenols. 4. Hydroxycinnamic acid-sugar derivatives.
Biochem. J. 81, 242-250 (1961)
- HATTORI, S. and M. SATO: The oxidation of arbutin by isolated chloroplasts of arbutin-containing plants.
Phytochemistry 2, 385-395 (1963)
- HENDERSON, M.E.K.: Release of aromatic compounds from birch and spruce sawdust during decomposition by white-rot fungi.
Nature (London) 175, 634-635 (1955)
- HENDERSON, M.E.K.: The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some Hyphomycetes and yeast-like fungi of soil.
J. gen. Microbiol. 26, 155-165 (1961)
- HESS, D.: Phasen der Anthocyanbildung in der Blütenentwicklung von *Petunia hybrida*.
Planta 59, 567 (1963)
- HESS, D.: Der Einbau Methylgruppen - markierter Ferulasäure und Sinapinsäure in die Anthocyane von *Petunia hybrida*.
Planta 60, 568 (1964)
- HIGUCHI, T. and S.A. BROWN: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon.
Canad. J. Biochem. Physiol. 41, 65-76 (1963)
- HUTCHINSON, A., CH. ROY und G.H.N. TOWERS: Synthesis of phlorin and other phenolic glucoside by plant tissues.
Nature 181, 841-842 (1958)
- IBRAHIM, R.K. and G.H.N. TOWERS: Conversion of salicylic acid to gentisic acid, all labelled with carbon-¹⁴C in plants.
Nature 184, 1803 (1959)
- IBRAHIM, R.K. and G.H.N. TOWERS: Identification, by chromatography, of plant phenolic acids.
Arch. Biochem. Biophys. 87, 125-128 (1960)
- ISHIKAWA, H., W.J. SCHUBERT und F.F. NORD: Investigations on lignins and lignification. XXVII. The enzymic degradation of softwood lignin by white-rot fungi.
Arch. Biochem. Biophys. 100, 131-139 (1963)

- JACKSON, W.A. and N.T. COLEMAN: Fixation of carbondioxide by plant roots through phosphoenolpyruvate carboxylase.
Plant and Soil 11, 1-16 (1959)
- JACKSON, W.A. et.al.: Ion absorption by bean roots and organic acid changes brought about through CO₂-fixation.
Soil Sci. 87, 311-319 (1959)
- JACOBSON, L.: Carbondioxide fixation and ion absorption in barley roots.
Plant Physiol. 30, 264-269 (1955)
- JENSEN, W.S. and A.D. McLAREN: Uptake of proteins by plant cells. The possible occurrence of pinocytosis in plants.
Exp. Cell Res. 19, 414-417 (1960)
- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1962
- KARRER, W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe.
Birkhäuser-Verlag 1958
- KIPNIS, D.M. and C.F. CORI: Tissue permeability. (IV) Penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm.
J. Biol. Chem. 234, 171-177 (1959)
- KRATZL, K. und G. BILLEK: Über die Synthese von mit ¹⁴C-markierten Ligninbausteinen.
Holzforsch. 7, 66-70 (1953)
- KRATZL, K. und G. BILLEK: Die Synthese des mit ¹⁴C- am C-3 der Seitenkette markierten p-Cumaralkoholglucosides und des Syringins.
Mh. Chem. 85, 845-855 (1954)
- KRATZL, K. und G. BILLEK: Zur Biogenese des Lignins.
Holzforsch. 10, 161-178 (1956)
- KRATZL, G. und G. PUSCHMANN: Präparative Trennungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.
Holzforsch. 14, 1-4 (1960)
- KURSANOV, A.L.: Die Aufnahme von Kohlensäure durch das Wurzelsystem der Pflanzen.
Ref. Landwirtsch. Zbl. II, 418 (1956)

- LEISTNER, E. and M.H. ZENK: Incorporation of shikimic acid into 1,2-Dihydroxyanthraquinone (Alizarin) by *Rubia tinctorum* L.
Tetrahedron Letters No.5, 475-476 (1967)
- LICHSTEIN, H.C. and R.B. FERGUSON: Permeability of *Lactobacillus arabinosus* to biotin.
J. biol. Chemistry 233, 243-244 (1958)
- LIEBIG, J.v.: Die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Agrikultur und Physiologie.
Würzburg 1940
- LIM, S.U.: Beiträge zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen dem mikrobiellen Abbau des Lignins und der Bildung von Humusstoffen.
Diss. d. Landwirtschaftl. Fak. d. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1965)
- MAEDER, H.: Chemische und pflanzenphysiologische Untersuchungen mit Rottestroh.
Diss. d. Landwirtschaftl. Fak. d. Justus-Liebig-Universität Giessen (1960)
- MASON, H.S.: Mechanisms of oxygen metabolism.
Advances in Enzymol. 19, 79-231 (1957)
- MAYER, A.M.: Natur und Ort der Phenolase im keimenden Salat.
Physiol. Plantarum 14, 322 (1961)
- MAYER, A.M.: Inhibition and substrate specificity of Lettuce phenolase.
Phytochemistry 1, 237-239 (1962)
- MCCALLA, D.R. and A.C. NEISH: Biosynthesis of phenolic cinnamic acids.
Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 537 (1959)
- MCCALLA, T.M. and F.A. HASKINS: Phytotoxic substances from soil microorganisms and crop residues.
Bacteriol. Rev. 28, 181-207 (1964)
- McLAREN, D.A., W.A. JENSEN and L. JACOBSEN: Absorption of enzymes and other proteins by barley roots.
Plant Physiol., Lancaster 35, 349-356 (1960)
- MEIER, H. und M.H. ZENK: Einbau von 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure in Delphinidin.
Z. Pflanzenphysiol. 53, 415-421 (1965)
- MENGEL, K. und H. MARSCHNER: Die aktive Ionenaufnahme durch die Pflanzenzelle.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 100, 193-207 (1963)

- MERKENSCHLAGER, M., K. SCHLOSSMANN und W. KURZ: A mechanical cell homogenizer and its application to biological problems.
Biochem. Z. 329, 322-401 (1957)
- MONOD, J.J.: Biosynthesis of an enzyme-information, induction, repression.
Angew. Chem. 71, 685-691 (1959)
- NAIR, F.M. and L.C. VINING: Cinnamic acid hydroxylase in spinach.
Phytochemistry 4, 161 (1965)
- NEISH, A.C.: Major pathways of biosynthesis of phenols in: Biochemistry of phenolic compounds.
ed. J.B. HARBORNE p- 354 Academic Press
London 1964
- NORD, F.F. and J.C. VITUCCI: On the mechanism of enzyme action. XXXI. The mechanism of methyl-p-methoxycinnamate formation by *Lentinus lepideus* and its significance in lignification.
Arch. Biochem. 15, 465-471 (1947)
- ORGANIC Syntheses. Darstellung von 2,3,4,6-Tetraacetyl- β -Glucose.
Organic Syntheses Vol. 25, S. 53 (1949) Verlag John Wiley and Sons.
- OVERSTREET, R. et.al.: The absorption of bicarbonate ion by barley plants as indicated by studies with radioactive carbon.
Proc. nat. Acad. Sci. USA 26, 688 (1940)
- PAECH, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe.
Springer-Verlag 1950
- PENNEL, G.A. and P.E. WEATHERLEY: Mechanism of sugar uptake by floating leaf disks.
New Phytologist 57, 326-339 (1958)
- PILET, P.E.: Effect of p-hydroxybenzoic acid on growth, auxin content and auxin catabolism.
Phytochemistry 3, 493-497 (1964)
- POEL, L.W.: Carbon dioxide fixation by barley roots.
J. exp. Bot. 4, 157-163 (1953)
- PONTING, J.D. and M.A. JOSLYN: Ascorbic acid oxidation and the browning in apple-tissue extracts.
Arch. Biochem. 19, 47 (1948)

- FRIDHAM, J.B. and M. SALTmarsh: The biosynthesis of phenolic glucosides in plants.
Biochem. J. 87, 218-224 (1963)
- FRIDHAM, J.B.: The phenol glucosylation reaction in the plant kingdom.
Phytochemistry 3, 493-497 (1964)
- REZNIK, H. und R. URBAN: Über den Metabolismus ^{14}C -markierter Ferulasäure im Pflanzenversuch.
Naturwissenschaften 44, 13 (1959)
- RUNECKLES, V.C. and K. WOOLRICH: Tobacco polyphenols. I. The biosynthesis of O-Glucosides and O-Glucose esters of hydroxycinnamic acids.
Phytochemistry 2, 1-6 (1963)
- SAALBACH, E.: Zur Kenntnis der Huminsäuren. XIV. Mitteilung.
Einfluß von Modellsubstanzen von Humusstoffen auf den Stoffwechsel von Getreide.
Landwirtsch. Forsch. 9. Sonderheft 95-100 (1957)
- SALTMAN, P. et.al.: The dark fixation of CO_2 by succulent leaves; Metabolic changes subsequent to initial fixation.
Plant Physiol. 32, 197 (1957)
- SATO, M.: Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts-II. Conversion by the isolated chloroplasts of p-Coumaric acid to caffeic acid.
Phytochemistry 5, 385-389 (1966)
- SCHEFFER, F., R. KICKUTH und H. LORENZ: Über saure organische Verbindungen in Sproß, Wurzel und im steril gehaltenen Wurzelraum von Mais.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 110, 201-210 (1965)
- SCHMID, H. und K. SCHMID: Zur Kenntnis der Claisen Umlagerung. II. Versuch mit ^{14}C .
Helv. chim. Acta 36, 489-500 (1953)
- SCHMID, G. und W. FLAIG: Pflanzenstoffwechsel und Wirkstoffe.
Landbauforsch. Völknerode 12, 51-56 (1962)
- SCHÖNBECK, F.: Weitere Untersuchungen über die Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von Pflanzen durch Aufnahme phenol- und cumarinartiger Verbindungen aus Nährlösungen und Boden.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 98, 126-136 (1962)
- SCHUMAKER, V.N.: Uptake of protein from solution of Amoeba proteus.
Exp. Cell. Res. 15, 314-331 (1958)

- SEIDEL, K.: Phenol-Abbau im Wasser durch *Scirpus lacustris* L. während einer Versuchsdauer von 31 Monaten. *Naturwissenschaften* 52, H.13, 398 (1965)
- SEIDEL, K.: Reinigung von Gewässern durch höhere Pflanzen. *Naturwissenschaften* 53, H.12, 289-297 (1966)
- SEIFERT, K.: Die chemische Veränderung der Holzzellwand-Komponenten unter dem Einfluß pflanzlicher und tierischer Schädlinge. II. Abbau von *Pinus sylvestris* L. durch *Coniphora cerebella* Pers. *Holzforschung* 16, 102-113 (1962)
- SIMON, E.W. and H. BEEVERS: The effect of pH on the biological activities of weak acids and bases. I. The most usual relationship between pH and activity. *New Phytologist* 51, 163-190 (1952a)
- SIMON, E.W. and H. BEEVERS: The effect of pH on the biological activities of weak acids and bases. II. Other relationships between pH and activity. *New Phytologist* 51, 191-197 (1952b)
- van SLIKE, D.D., J. PLAZIN and J.R. WEISIGER: Reagents for the van Slyke-Folch wet carboncombustion. *J. biol. Chemistry* 191, 299-304 (1951)
- SÜCHTIG, H.: Inwieweit können Strohrotteprodukte das Pflanzenwachstum beeinflussen? Über Veränderungen von Ligninabbauprodukten. *Landbauforsch. Völkenrode* 11, 16-18 (1961a)
- SÜCHTIG, H.: Erfassung der bei der Strohrotte gebildeten Ligninabbauprodukte: Kennzeichnung durch UV-Spektren. *Landbauforsch. Völkenrode* 11, 13-15 (1961b)
- SPRINSON, D.B.: Biosynthesis of aromatic compounds from D-glucose. *Advances Carbohydrate Chem.* 15, 235 (1960)
- STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie*. Springer-Verlag 1962
- STANIER, R.Y. and J.L. INGRAHAM: Protocatechuic acid oxidase. *J. biol. Chemistry* 210, 799-808 (1954)
- STEIN, W.D.: N-terminal histidine at the active center of a permeability mechanism. *Nature (London)* 181, 1662-1663 (1958)
- de STEVENS, G. and F.F. NORD: Lignin formation based on the oxidation of native and enzymically liberated lignin. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 39, 80-84 (1953)

- STOLWIJK, K.J. and K.V. THIMANN: On the uptake of carbon dioxide and bicarbonate by roots and its influence on growth.
Plant Physiol. 32, 513-519 (1957)
- STROH, H.H., H. SCHÄFER und E. HASCHKE: D-Glucoseester von Hydroxyzimtsäuren in *Sambucus nigra* L.
Z. Chem. 2, 373-374 (1962)
- TANAKA, J.: Studien über die Ernährung der höheren Pflanzen mit den organischen Verbindungen.
Japan J. Botany 323-350 (1930/31)
- THAER, A.: Die Grundsätze der rationellen Landwirtschaft.
Reiner-Verlag Berlin 1821.
- VIRTANEN, A.J.: Organic nitrogen compounds and higher plants. Sitzungsbericht der Finnischen Akademie der Wissenschaften 1946, Helsinki 1947
- VIRTANEN, A.J. und SCHWYZER, R.: The uptake of lower aliphatic amines by pea plants.
Acta chem. Scand. 5, 1391-1398 (1951)
- VIRTANEN, A.J. and H. LINKOLA: On the effect of amino acids and amines on the growth and the form of the pea plant.
Suom. Kem. B. 30, 220-221 (1957)
- WALLERIUS, J.: Agricultural fundaments chemica. Uppsala 1761.
Erwähnt bei M.M. Kononowa: Die Humusstoffe des Bodens.
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin (1958)
- WEISSFLOG, J.: Studien zum Phosphorstoffwechsel in der höheren Pflanze. II. Zur sterilen Kultur der höheren Pflanze.
Planta 19, 170-181 (1933)
- WELTE, E. und G. TROLLDENIER: Der Einfluß der Bodenmikroorganismen auf Trockensubstanzbildung und Aschegehalt in Nährlösung wachsender Pilze.
Arch. Mikrobiol. 43, 138-147 (1962)
- WIELAND, Th. und G. PFLEIDERER: Analytische und mikropräparative Trägerrelektrophorese mit höheren Spannungen.
Angew. Chem. 67, 257 (1955)
- WINTER, A.G. und F. SCHÖNBECK: Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. II. Phenol.
Naturwissenschaften 46, 536 (1959)

- WINTER, A.G., H. PREUSS und F. SCHÖNBECK: Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. I. Phenolische Verbindungen.
Naturwissenschaften 46, 537 (1959)
- WINTER, A.G., L. RINGS-WILLEKE und F. SCHÖNBECK: Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. 3. Mitt. Alkaloide.
Naturwissenschaften 46, 656 (1959)
- WINTER, A.G., H. SCHÖNBECK-PREUSS und F. SCHÖNBECK: Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. IV. Bildungserscheinungen allochthonen Arbutins und Phlorins.
Naturwissenschaften 46, 673-674 (1959)
- WINTER, A.G., G. BRÜSEWITZ und F. SCHÖNBECK: Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. VI. Die Bildung allochthoner Substanzen in Weizen auf natürlichen Böden.
Naturwissenschaften 47, 139-140 (1960)
- WISE, L.E., M. MURPHY and A.A. D'ADDIECO: Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses.
Paper Trade J. 122, 35 (1946)
- WOSILAIT, W.D. and A. NASON: Pyridine nucleotide-quinone reductase. I. Purification and properties of the enzyme from pea seeds.
J. biol. Chemistry 206, 255-270 (1954)
- ZENK, M.H.: Zur Frage der Stoffwechselprodukte der Benzoesäure in höheren Pflanzen.
Planta 58, 668-672 (1962)
- ZENK, M.H.: Zur Frage der Biosynthese von Gallussäure.
Z. Naturforsch. 19b, 83-84 (1964a)
- ZENK, M.H. und G. MÜLLER: Biosynthese von p-Hydroxybenzoesäure und andere Benzoesäuren in höheren Pflanzen.
Z. Naturforsch. 19b, 398-405 (1964)
- ZENK, M.H.: Einbau von p-Hydroxybenzoesäure in die Hydrochinonkomponente des Arbutins in *Bergenia crassifolia*.
Z. Naturforsch. 19b, 856-857 (1964b)

- ZENK, M.H.: Reduktion von Veratrumsäure zu Veratrylaldehyd und Veratrylalkohol durch zellfreie Extrakte von *Polystictus versicolor* L.
Z. Pflanzenphysiol. 53, 356-362 (1965a)
- ZENK, M.H.: Biosynthese von Vanillin in *Vanilla planifolia* Andr.
Z. Pflanzenphysiol. 53, 404-414 (1965b)
- ZENK, M.H.: Biosynthesis of C₆-C₁ compounds; reprinted from Biosynthesis of aromatic compounds. Proceedings of the 2nd meeting of the federation of European Biochemical Societies: Volume 3. Pergamon Press 1966.

Lebenslauf

Am 30. September 1936 wurde ich als Sohn des Gärtnermeisters Johannes Harms und seiner Ehefrau Meta geb. Wilken in Sillenstede, Kreis Friesland geboren. Von April 1942 bis April 1948 besuchte ich die Volksschule in Sillenstede und von April 1948 bis März 1954 die Städt. Mittelschule für Jungen in Wilhelmshaven.

Am 1. April 1954 trat ich eine Gärtnerlehre in der Firma Fr. Böhme und Söhne in Wilhelmshaven an. Meine Gehilfenprüfung legte ich am 28.9.1956 vor der Landwirtschaftskammer in Oldenburg ab. Bis zum März 1957 war ich als Gärtnergehilfe im elterlichen Betrieb tätig.

Aufgrund meiner Leistungen bei der Gehilfenprüfung wurde ich von der Landwirtschaftskammer Oldenburg der Leitung der Hermann Lietz-Schule - Anerkanntes privates neusprachliches und math.-naturwissenschaftliches Gymnasium für Jungen - in Spiekeroog/Nordsee als Werkschüler vorgeschlagen. Dort setzte ich von April 1957 meine Schulausbildung bis zum Abitur im März 1960 fort. Während dieser Zeit oblag mir die Leitung der gärtnerischen Anlagen der Schule und die Anleitung der Schüler zu praktischen Arbeiten.

Im Sommersemester 1960 begann ich an der Justus Liebig-Universität in Giessen das Biologiestudium, das ich im Laufe der Jahre um die Fachrichtungen Mikrobiologie und Chemie erweiterte. Während der Semesterferien war ich im Biologischen Institut der Farbenfabriken Bayer, im Hygiene-Institut der medizinischen Fakultät in Giessen und in einer Institution für Compost Science in Gifford/Schottland tätig, um Einblicke in die Praxis zu gewinnen.

Von April 1964 bis Mai 1967 arbeitete ich am Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode an meiner Dissertation.

